

Einfluss von ausgewählten Cyclodextrinen auf die corneale Metabolisierung und auf das Penetrations- und Permeationsverhalten von Dipivefrin

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Pharmazie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dipl.-Pharm. Udo Rettkowski
geboren am 27.04.1969 in Halle/Saale

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. S. Keipert
2. Prof. Dr. H.-H. Borchert
3. Prof. Dr. A. Langner

eingereicht am: 17. Dezember 2002
Tag der mündlichen Prüfung: 20. Mai 2003

Abstract

The aim of the present work was to study the influence of different cyclodextrins (α -, HP- α -, β -, HP- β , γ - und HP- γ -cyclodextrin) as components of eye drops on the enzymatic hydrolysis of dipivefrine in the corneal epithelium. Therefor, enzymatic degradation of dipivefrine by corneal enzymes of bovine eyes and by the purified enzyme butyryl cholinesterase was investigated. The interaction of dipivefrine with cyclodextrins was tested in aqueous solution by the use of ultrafiltration, high performance liquid chromatography, UV- and ^1H -NMR-spectroscopy. The interaction of dipivefrine with corneal tissue was tested by the use of thermal analysis and electron microscopy. The influence of some cyclodextrins on the in-vitro permeation of dipivefrine through porcine cornea and the simultaneous enzymatic release of epinephrine in the corneal epithelium was investigated. The forced permeation of water through cornea from the endothelial to epithelial site was tested with help of a pressurized permeation device and the modell data were calculated to meet the physiological pressure in the eye.

Keywords:

Dipivefrine, Cornea, Cyclodextrins, Enzyme

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von ausgewählten Cyclodextrinen (α -, HP- α -, β -, HP- β -, γ - und HP- γ -Cyclodextrin) als Hilfsstoffe in Ophthalmika auf die enzymatische Esterspaltung von Dipivefrin im Corneaepithel. Dazu waren neben der Betrachtung der enzymatischen Spaltung von Dipivefrin durch corneale Enzyme von Rinderaugen und dem Reinenzym Butyrylcholinesterase Untersuchungen zu den Wechselwirkungen von Dipivefrin mit den verwendeten Cyclodextrinen und dem cornealem Gewebe notwendig. Zur Charakterisierung der Dipivefrin/Cyclodextrin-Wechselwirkungen in wässriger Lösung wurden die Ultrafiltration, die Hochleistungs-Flüssigchromatographie und die UV- bzw. ^1H -NMR-Spektroskopie eingesetzt. Die Ermittlung der Dipivefrin- bzw. Cyclodextrin-Wechselwirkung mit dem cornealen Gewebe erfolgte mittels Thermoanalytik und Elektronenmikroskopie. Der Einfluss ausgewählter Cyclodextrine auf die in-vitro-Permeation von Dipivefrin durch die Schweinecornea und auf die dabei im Corneaepithel stattfindende enzymatische Freisetzung von Epinephrin wurde untersucht. Mit Hilfe einer Druckpermeationszelle wurde der Einfluss von Dipivefrin bzw. in Kombination mit α - und β -Cyclodextrin auf die forcierte Permeation von Wasser durch die Cornea von endothelial nach epithelial untersucht und die Modelldaten auf den physiologischen Druck des Auges umgerechnet.

Schlagwörter:

Dipivefrin, Cornea, Cyclodextrine, Enzym

MEINEN ELTERN

Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Sigrid Keipert für die Überlassung des Themas und ihre Bereitschaft, auch schwierige Phasen der wissenschaftlichen Arbeit mit zahlreichen Anregungen und Diskussionen zu begleiten.

Für die Ausführung der thermoanalytischen Versuche und die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Hochschule Wismar. Für die Durchführungen und Hilfe bei der Auswertung der ^1H -NMR-Messungen danke ich Herrn Dr. Mügge von der Arbeitsgruppe NMR des Fachbereichs Chemie.

Für das freundschaftliche Arbeitsklima bedanke ich mich bei den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe „Pharmazeutische Technologie“ und allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin.

Den studentischen Hilfskräften Frau Carola Flenner, Frau Eileen Timm und Herrn Martin Herrmann sei an dieser Stelle für deren engagierte Mithilfe bei einer Vielzahl von Untersuchungen gedankt.

Für die Unterstützung der Arbeit mit Substanzen (Dipivefrin, Cyclodextrine) sein den Firmen Klinge Pharma und Merck gedankt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	11
1 Einleitung	14
2 Problemstellung	16
3 Grundlagen	18
3.1 Das menschliche Auge	18
3.1.1 Allgemeine Bemerkungen	18
3.1.2 Anatomie	18
3.1.3 Enzymsysteme des Auges	23
3.1.3.1 Phase-I-Reaktionen (Funktionalisierung)	23
3.1.3.2 Phase-II-Reaktionen (Konjugationen)	24
3.1.3.3 Phase-I-Enzyme	24
3.1.3.4 Phase-II-Enzyme	27
3.1.3.5 Esteraseaktivität im Auge	29
3.1.4 Das Glaukom	30
3.1.4.1 Pathologie	30
3.1.4.2 Medikamentöse Behandlung	32
3.2 Verwendete Substanzen	35
3.2.1 Dipivefrin	36
3.2.1.1 Geschichte	36
3.2.1.2 Synthese	36
3.2.1.3 Eigenschaften	37
3.2.1.4 Stabilität und Abbau	38
3.2.1.5 Pharmakologie	40
3.2.1.6 Präparate	41
3.2.2 Cyclodextrine	42
3.2.2.1 Native Cyclodextrine	42

3.2.2.2	Substituierte Cyclodextrine	45
3.2.2.3	Toxizität der Cyclodextrine	46
3.2.3	Butyrylcholinesterase	47
4	Enzymatische Untersuchungen	48
4.1	Allgemeine Bemerkungen	48
4.2	Der diskontinuierliche Rührkesselreaktor	48
4.2.1	Charakteristische Eigenschaften des isothermen Reaktors	48
4.2.2	Bilanzgleichungen des idealen Reaktors	49
4.3	Probenvorbereitung	50
4.4	Versuchsdurchführung	52
4.5	Auswertung	53
4.5.1	Vorversuche	53
4.5.2	Dipivefrin-Abbau im Cornea-Homogenat	57
4.5.3	Dipivefrin-Abbau durch das Reinenzym Butyrylcholinesterase	60
4.5.4	Vergleich des Dipivefrin-Abbaus im Homogenat und durch das Reinenzym	62
4.6	Diskussion	64
5	Wechselwirkungen zwischen Dipivefrin und Cyclodextrinen	69
5.1	Allgemeine Bemerkungen	69
5.2	Membranverfahren: Ultrafiltration	70
5.2.1	Allgemeine Bemerkungen	70
5.2.2	Theoretische Betrachtungen	73
5.2.3	Versuchsdurchführung	76
5.2.4	Ergebnisse	77
5.2.4.1	Filtermaterial	77
5.2.4.2	Dipivefrin-Konzentration im Permeat	78
5.2.4.3	Permeatfluss	79
5.2.4.4	Cyclodextrin-Durchtritt durch die Membran	79
5.2.5	Diskussion	80
5.3	Chromatographisches Verfahren: HPLC	81
5.3.1	Allgemeine Bemerkungen	81
5.3.2	Theoretische Grundlagen	82
5.3.3	Versuchsdurchführung	84
5.3.4	Ergebnisse	85
5.3.5	Diskussion	86
5.4	Spektroskopische Analysenmethoden	87
5.4.1	Allgemeine Bemerkungen	87
5.4.2	UV-Spektroskopie	88
5.4.2.1	Theoretische Grundlagen	88
5.4.2.2	Versuchsdurchführung	89

5.4.2.3	Ergebnisse	89
5.4.2.4	Diskussion	92
5.4.3	¹ H-NMR-Spektroskopie	93
5.4.3.1	Theoretische Grundlagen	93
5.4.3.2	Versuchsdurchführung	96
5.4.3.3	Ergebnisse und Diskussion	97
6	Wechselwirkungen mit dem cornealen Gewebe	98
6.1	Zielstellung	98
6.2	Thermoanalytik	98
6.2.1	Allgemeine Bemerkungen	98
6.2.2	Theoretische Grundlagen	99
6.2.3	Beeinflussende Faktoren	101
6.2.4	Probennahme und Probenvorbereitung	103
6.2.5	DTA/TG-Versuchsdurchführung	103
6.2.6	Auswertung	104
6.3	Elektronenmikroskopie	106
6.3.1	Allgemeine Bemerkungen	106
6.3.2	Probenvorbereitung	108
6.3.3	Versuchsdurchführung	108
6.3.4	Ergebnisse	109
6.3.5	Diskussion	110
7	Permeation von Dipivefrin durch Schweinecornea	113
7.1	Allgemeine Bemerkungen	113
7.2	Grundlagen der Permeationsuntersuchung	114
7.2.1	Permeationsmodelle	114
7.2.2	Biologischen Barrieren	115
7.2.3	Transport durch biologische Barrieren	116
7.2.4	Mathematisch-Physikalische Betrachtung	116
7.2.4.1	Diffusion	116
7.2.4.2	Fick'sche Diffusionsgesetze	118
7.2.4.3	Diffusionskoeffizient	120
7.2.4.4	Permeation durch eine Membran	122
7.2.4.5	Verteilungskoeffizient	123
7.2.4.6	Permeabilitätskoeffizient	123
7.2.4.7	Diffusion durch „Poren“	124
7.2.4.8	Diffusion durch mehrschichtige Membranen	124
7.2.4.9	Apparenter Permeabilitätskoeffizient	125
7.3	Versuchsdurchführung	127
7.3.1	Modellaufbau	127
7.3.2	Permeationsversuche	127
7.3.2.1	Ergebnisse und Diskussion	128

8	Forcierte, umgekehrte Permeation	132
8.1	Allgemeine Bemerkungen	132
8.2	Theoretische Grundlagen	133
8.3	Entwicklung einer Modellzelle	135
8.3.1	Anforderungen an die Zelle	135
8.3.2	Technische Beschreibung	136
8.4	Versuchsdurchführung	138
8.5	Ergebnisse	139
8.6	Diskussion	141
8.6.1	Modell-Theorie	141
8.6.2	Modell-Rechnung am Beispiel Schweinecornea	144
9	Zusammenfassung	148
	Literaturverzeichnis	152
A	Methoden	174
A.1	Gehaltsbestimmungen	174
A.1.1	UV/VIS-Spektroskopie	174
A.1.2	HPLC (Dipivefrin, Epinephrin)	174
A.1.3	Polarimetrie	175
A.2	Bestimmung physikalisch-chemischer Parameter	177
A.2.1	pH-Wert	177
A.2.2	Osmolarität	177
A.3	Überprüfung der lagerungsbezogenen enzymatischen Aktivität des Epithelhomogenats	178
A.4	Statistik	179
B	Geräte	180
C	Chemikalien	182
D	Abbildungen	185
D.1	Hydrolyse-Umsätze im Epithel-Homogenat	185
D.2	Hydrolyse-Umsätze durch ButChE	187
D.3	Umsatz-Vergleich Homogenat vs. ButChE	189
D.4	Normierte Dipivefrin-Umsätze	192
D.5	DPE-Konzentrationen der Ultrafiltration	195
D.6	Permeatmengen der Ultrafiltration	196
D.7	Normierte UV-Absorptionsänderungen	198
D.8	Prozentuale Änderung der Nettoretentionszeiten	199
D.9	Thermoanalytische Diagramme	200
D.10	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Corneaschnitten, Vergrößerung 320x	205

D.11 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Corneaschnitten, Vergrößerung 2000x	211
D.12 Permeationen durch Schweinecornea	213

Abbildungsverzeichnis

3.1	Schnittbild des Auges	19
3.2	Aufbau der Cornea	22
3.3	Kammerwinkel	31
3.4	Glaukomtherapie	33
3.5	Dipivefrin	36
3.6	Dipivefrin-Abbau	39
3.7	Epinephrin-Abbau	39
3.8	Cyclodextrin-Synthese	43
3.9	α -, β -, und γ -Cyclodextrin	45
4.1	Hydrolyse im Puffer (5 h)	55
4.2	Hydrolyse im Homogenat (5 h)	56
4.3	Hydrolyse, Puffer vs. Homogenat	57
4.4	DPE-Abbau im Homogenat (90 min)	58
5.1	Mikroporöse Membran	71
5.2	Anisotrope Ultrafiltrationsmembran	72
5.3	Ultrafiltrationen von Barbitol, β -CD	74
5.4	Ultrafiltration von DPE, β - und HP- β -CD	78
5.5	Nettoretentionszeiten, DPE	87
5.6	UV-Absorptionen des DPE bei 263 nm	90
5.7	UV-Absorptionen des DPE bei 269 nm	91
7.1	Permeation durch Schweinecornea, DPE	129
8.1	Membran-Mikro-Reaktor	137
8.2	Wasserpermeation, Rindercornea	140
8.3	Wasserpermeation, Schweinecornea	141
D.1	DPE-Umsatz, Homogenat, α -, HP- α -CD	185
D.2	DPE-Umsatz, Homogenat, β -, HP- β -CD	186
D.3	DPE-Umsatz, Homogenat, γ -, HP- γ -CD	186
D.4	DPE-Umsatz, ButChE, α -, HP- α -CD	187
D.5	DPE-Umsatz, ButChE, β -, HP- β -CD	187

D.6 DPE-Umsatz, ButChE, γ -, HP- γ -CD	188
D.7 DPE-Umsatz, Homogenat vs. ButChE, α -CD	189
D.8 DPE-Umsatz, Homogenat vs. ButChE, HP- α -CD	189
D.9 DPE-Umsatz, Homogenat vs. ButChE, β -CD	190
D.10 DPE-Umsatz, Homogenat vs. ButChE, HP- β -CD	190
D.11 DPE-Umsatz, Homogenat vs. ButChE, γ -CD	191
D.12 DPE-Umsatz, Homogenat vs. ButChE, HP- γ -CD	191
D.13 Normierter DPE-Umsatz, α -CD	192
D.14 Normierter DPE-Umsatz, HP- α -CD	192
D.15 Normierter DPE-Umsatz, β -CD	193
D.16 Normierter DPE-Umsatz, HP- β -CD	193
D.17 Normierter DPE-Umsatz, γ -CD	194
D.18 Normierter DPE-Umsatz, HP- γ -CD	194
D.19 Ultrafiltration von DPE, α - und HP- α -CD	195
D.20 Ultrafiltration von DPE, γ - und HP- γ -CD	195
D.21 Permeatmenge, α -, HP- α -CD	196
D.22 Permeatmenge, β -, HP- β -CD	196
D.23 Permeatmenge, γ -, HP- γ -CD	197
D.24 Normierte UV-Absorptionsänderung, 263 nm	198
D.25 Normierte UV-Absorptionsänderung, 269 nm	198
D.26 Nettoretentionszeiten, DPE	199
D.27 DTA/TG von DPE	200
D.28 DTA/TG, Vergleich 1, DPE, β -CD	201
D.29 DTA/TG, Vergleich 2, DPE, β -CD	202
D.30 DTA/TG, Vergleich 1, DPE, α -CD	203
D.31 DTA/TG, Vergleich 2, DPE, α -CD	204
D.32 Aufnahme Corneaschnitt, Puffer, 320x	205
D.33 Aufnahme Corneaschnitt, Puffer+DPE, 320x	206
D.34 Aufnahme Corneaschnitt, Puffer+ α -CD, 320x	207
D.35 Aufnahme Corneaschnitt, Puffer+ β -CD, 320x	208
D.36 Aufnahme Corneaschnitt, Puffer+DPE+ α -CD, 320x	209
D.37 Aufnahme Corneaschnitt, Puffer+DPE+ β -CD, 320x	210
D.38 Aufnahme Corneaschnitt, Puffer+DPE, 2000x	211
D.39 Aufnahme Corneaschnitt, Puffer+DPE+ α -CD, 2000x	212
D.40 Permeation durch Schweinecornea, DPE, α -CD	213
D.41 Permeation durch Schweinecornea, DPE, γ -CD	213
D.42 Permeation durch Schweinecornea, DPE, HP- β -CD	214
D.43 Permeation durch Schweinecornea, EPI, HP- β -CD	214

Tabellenverzeichnis

3.1	Löslichkeit von Dipivefrin	37
3.2	Verteilungskoeffizienten	38
3.3	Eigenschaften der nativen Cyclodextrine	44
3.4	Toxikologische Daten der Cyclodextrine	46
4.1	Hydrolyse im Puffer (5 h)	54
4.2	Hydrolyse im Homogenat (5 h)	55
4.3	Zusammenfassung Homogenat	59
4.4	Zusammenfassung Reinenzym	61
4.5	Normierte Dipivefrin-Abbauraten, Homogenat	63
4.6	Normierte Dipivefrin-Abbauraten, ButChE	63
5.1	Methoden zur Wechselwirkungsbestimmung	70
5.2	Cyclodextrin-Durchtritt	80
5.3	Nettoretentionszeiten, DPE	86
5.4	Normierte UV-Absorptionszunahme, 263 nm	91
5.5	Normierte UV-Absorptionszunahme, 269 nm	92
6.1	Mechanisch Probeneigenschaften	109
7.1	Bedingungen für die Permeation	128
7.2	Permeationsdaten	131
8.1	Untersuchungslösungen für die Druckzelle	138
8.2	Ergebnisse Druckzelle	139
A.1	HPLC-Parameter	175
A.2	Polarimetereinstellungen	176
A.3	Spezifische Drehung der Cyclodextrine	177
A.4	Langzeitlagerung	178
C.2	Eigenschaften der Butyrylcholinesterase	183
C.3	Zusammensetzung des Phosphatpuffers pH 2,0	184
C.4	Zusammensetzung des Puffers pH 7,4	184

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Erläuterung</i>
α -CD	α -Cyclodextrin
AChE	Acetylcholinesterase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
β -CD	β -Cyclodextrin
ButChE	Butyrylcholinesterase
CD	Cyclodextrin
cEH	cytosolische Epoxidhydrolase
CGTase	Cyclodextrin-Glycosyltransferase
ChE	Cholinesterase
COMT	Catechol O-Methyltransferase
CYP	Cytochrom P450
DM- β -CD	Dimethyl- β -Cyclodextrin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPE	Dipivefrin
DPE-HCl	Dipivefrinhydrochlorid
DTA	Differenzthermoanalyse
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EH	Epoxidhydrolase
ELMI	Elektronenmikroskopie
EPI	Epinephrin
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase
γ -CD	γ -Cyclodextrin
GST	Gluthathion-S-Transferase
HE- β -CD	Hydroxyethyl- β -Cyclodextrin
HP- α -CD	Hydroxypropyl- α -Cyclodextrin
HP- β -CD	Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin
HP- γ -CD	Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)

<i>Abkürzung</i>	<i>Erläuterung</i>
HOMT	Hydroxyindol O-Methyltransferase
IOP	Intra ocular pressure (Intraokularer Druck)
K_V	Verteilungskoeffizient
LDH	Lactatdehydrogenase
M- α -CD	Methyl- α -Cyclodextrin
M_r	Relative Molekülmasse
MAO	Monoaminoxidase
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
MWCO	Molecular weight cutoff (Molekulare Ausschlussgrenze)
Na-EDTA	Dinatriummethylenediamintetraessigsäure
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernresonanz)
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (Kern-Overhauser-Messung mit „Spoil“-Gradienten in der Mischzeit)
ORD	Optische Rotationsdispersion
Pharm. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PS	Pivalylsäure
r	empirischer Korrelationskoeffizient
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur
s	empirische Standardabweichung
s_{rel}	relative empirische Standardabweichung
SBE- β -CD	Sulfobutylether- β -Cyclodextrin
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TG	Thermogravimetrie
TMS	Tetramethylsilan
\bar{x}	Mittelwert
ZNS	Zentralnervensystem

Kapitel 1

Einleitung

Das Auge stellt an die Arzneiformen zur lokalen Therapie auf Grund seines differenzierten Aufbaus hohe Anforderungen. Zur Entwicklung geeigneter galenischer Formulierungen ist die Kenntnis der verwendeten Arznei- und Hilfsstoffe sowie deren Wechselwirkungen untereinander und mit den Geweben im Auge von entscheidender Bedeutung.

Das dominierende Gewebe des äußeren Auges, das als Barriere gegenüber Fremdsubstanzen wirkt, ist die Cornea. Durch ihren mehrschichtigen Aufbau setzt sie eindringenden Stoffen einen deutlichen Widerstand entgegen und bestimmt somit die okulare Bioverfügbarkeit.

Ein in der Glaukomtherapie u. a. eingesetzter Arzneistoff ist Dipivefrin, ein Dipivalylester des Epinephrins [KABACK et al. 1976]. Das Prodrug Dipivefrin wurde in die Therapie eingeführt, um die Resorption von Epinephrin nach okularer Applikation zu verbessern und die Wirkstoffbelastung zu minimieren [KASS 1979]. Die Konzentration von Epinephrin in den zugelassenen Arzneimitteln beträgt 1–2 %. Demgegenüber ließ sich die therapeutische Konzentration bei Dipivefrin deutlich verringern und liegt in den derzeit auf dem Markt befindlichen Mono- und Kombinationspräparaten bei maximal 0,1 % Dipivefrinhydrochlorid [ROTE LISTE 2002], entsprechend 0,067 % Epinephrin.

Bei okularer Applikation wässriger Arzneistofflösungen fließt der überwiegende Teil durch die Tränenkanäle ab und kommt systemisch zur Resorption, was

zu deutlichen Nebenwirkungen führen kann [PFEIFER et al. 1995]. Auch in dieser Beziehung erwiesen sich Prodrugs durch die Verringerung der Substanzbelastung häufig als optimierend.

Die Hydrolyse von Dipivefrin ist temperatur- und pH-abhängig und wird ausführlich in der Literatur beschrieben [BRITTAIN 1993]. Bei einem pH-Wert von 7,4 hydrolysiert Dipivefrin schnell in Epinephrin und Pivalylsäure. Es wurden bisher vielfältige Versuche unternommen, um Dipivefrin in wässriger Lösung bei dem physiologischen pH 7,4 zu stabilisieren [JARHO et al. 1997]. In den derzeit auf dem Markt befindlichen Arzneimitteln wird allerdings ein euhydrischer pH-Wert im Bereich von 3,5–4,5 verwendet. Dieser pH-Wert stellt eine Kompromiss zwischen physiologischer Verträglichkeit und Stabilität des Arzneistoffes dar und berücksichtigt darüber hinaus die Bioverfügbarkeit des Pharmakons.

Zur Stabilisierung, Löslichkeitsverbesserung und Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Dipivefrin wurden bereits in einigen Arbeitsgruppen mit verschiedenen Cyclodextrinen (CD) unternommen, insbesondere mit SBE- β -CD und HP- β -CD [LOFTSSON und JÄRVINEN 1999]. Eine „Komplexierung“ zwischen dem Arzneistoff und den Kavitäten-bildenden CD wurde von den Autoren angenommen. Allgemein sind konzentrationsabhängige Beschleunigung oder Hemmung von hydrolytischen und enzymatischen Reaktionen durch Cyclodextrine seit langem in der Literatur bekannt [CHIN et al. 1968].

Kapitel 2

Problemstellung

Gegenstand der Untersuchungen vorliegender Arbeit war der Einfluss von Hilfstoffen in Ophthalmika auf die enzymatische Esterspaltung von relevanten Arzneistoffen. Dipivefrin diente als Modellarzneistoff eines Esterprodrugs. Als Hilfstoffe gelangten α -, β und γ -CD und deren Hydroxypropylderivate zur Überprüfung.

Für die ex-vivo-Versuche sollten die häufig in der Ophthalmikaforschung verwendeten Rinder- und Schweineaugen genutzt werden.

Für die Metabolisierungsuntersuchungen war das Epithel der Cornea, das ein besonders stoffwechselaktives Gewebe darstellt und mit dem ein Pharmakon nach Applikation im Auge primär in Kontakt tritt, von vorrangigem Interesse. Mit Hilfe eines Reinenzyms sollten die Stoffwechselleistungen vergleichend eingeschätzt werden.

Die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse erforderte weiterhin Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen DPE und den verwendeten Cyclodextrinen sowie zwischen dem cornealem Gewebe und Dipivefrin bzw. den Cyclodextrinen, wozu die folgenden Methoden herangezogen wurden: die Ultrafiltration, die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), die UV-Spektroskopie, die ^1H -NMR-Spektroskopie, die Differential-Thermo-Analyse/Thermogravimetrie (DTA/TG) sowie die Elektronenmikroskopie.

Durch in-vitro-Permeations- und Penetrationsmodelle sollte exemplarisch die

Einflussnahme von Cyclodextrinen auf die okulare Resorption von Dipivefrin ermittelt werden.

Durch Einsatz einer zu entwickelnden Druckzelle sollten der Einfluss auf den Diffusionsfluss des Wasser durch die Cornea unter Modellbedingungen untersucht und Rückschlüsse auf die physiologischen Bedingungen mit Hilfe eines mathematischen Modells gezogen werden.

Kapitel 3

Grundlagen

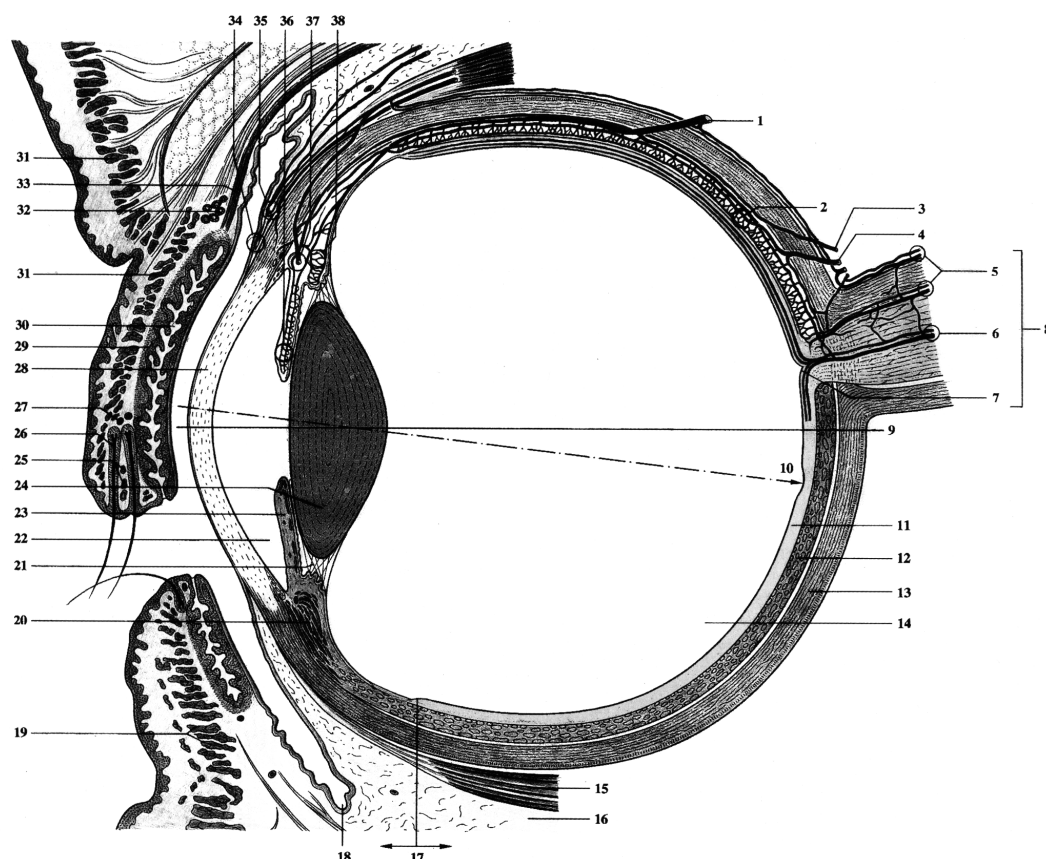
3.1 Das menschliche Auge

3.1.1 Allgemeine Bemerkungen

Für das Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge sowie für die pharmakologische Wirkung von topisch als auch systemisch angewandten Arzneistoffen ist die Kenntnis des anatomischen Aufbaus des Auges von größter Wichtigkeit. Von keinem anderen Sinnesorgan ist das menschliche Leben in so hohem Maße abhängig. Das visuelle System liefert mit Abstand die größte Informationsmenge über unsere Umwelt.

3.1.2 Anatomie

Das Sehorgan besteht aus dem Augapfel mit einem Gewicht von ca. 8 g und den Anhangsgebilden, zu denen Schutzeinrichtungen und ein Bewegungsapparat gehören. Die paarig angelegten Augäpfel (Bulbi oculi) liegen in Knochenhöhlen (Orbita) des vorderen Gesichtsschädels. Zu den Schutzeinrichtungen gehören die von sieben Knochenteilen gebildete Augenhöhle, die Augenlider (Palpebrae), die Bindehaut (Tunica conjunctiva) und der Tränenapparat (Apparatus lacrimalis).



1: V. vorticiosa, 2: Choroidea (Aderhaut) aus Lamina vasculosa und Lamina chorodocapillaris, 3: A. iridis, 4: Aa. choroideae, 5: Gefäße in der Dura- und Pia-scheide des Sehnerven, 6: A. und V. centralis retinae, 7: Discus N. optici (Blinder Fleck), 8: N. opticus (Sehnerv), 9: Bulbusachse, 10: Hauptsehlinie mit Macula, 11: Retina (Netzhaut), 12: Choroidea (Aderhaut), 13: Sclera (Lederhaut), 14: Corpus vitreum (Glaskörper), 15: M. rectus inferior, 16: Corpus adiposum, 17: Ora serrata »gezackter Rand«, die Übergangsstelle zwischen blinder Netzhaut (links) und lichtempfindlicher

Netzhaut (rechts), 18: Conjunctiva bulbi, 19: M. orbicularis oculi, 20: Corpus ciliare, 21: Zonulafasern, 22: Camera anterior (Vorderkammer des Auges), 23: Iris, 24: Lens (Linse), 25: Glandulae sebaceae (Zeissche Drüsen), 26: Zilien, 27: Glandulae ciliares (Mollsche Drüsen), 28: Cornea, 29: Tarsus, 30: Glandulae tarsalis (Meibomsche Drüsen), 31: M. orbicularis oculi, 32: Glandulae lacrimales, 33: M. tarsalis, 34: Randschlingennetz der Cornea, 35: Ramus conjunctivalis, 36: Gefäße der Iris, 37: Circulus iridis major, 38: Gefäße des Processus ciliaris.

Abbildung 3.1: Lateralschnitt durch das menschliche Auge [BECK und LANGE-HAGE 1995]

Die äußeren Augenmuskeln (Musculi bulbi), die Tenon-Kapsel (Vagina bulbi) und der Fettkörper (Corpus adiposum) sind die Bestandteile des Bewegungsapparates.

Die Augenlider (Abb. 3.1) verteilen durch einen unwillkürlich ausgelösten Lidschlag das Sekret der Tränendrüsen (Glandulae lacrimales), den Mucus der Goblet-Zellen und das Sekret der akzessorischen Tränendrüsen der Konjunktiva gleichmäßig über die Corneaoberfläche. Diese Prozesse dienen zur Befeuchtung, Ernährung und Reinigung. Von den $\approx 50 \mu\text{l}$ Tränenflüssigkeit befindet sich ungefähr die Hälfte im Bindehautsack, der Rest bildet den 5–10 μm dicken schützenden Tränenfilm [MISHIMA 1965, MISHIMA et al. 1966]. Der Abfluss über den Weg Tränenkanälchen-Tränensack-Tränennasengang in die Nasenhöhle und die Verdunstung aus dem Tränenfilm werden durch eine Neubildungsrate von 1–2 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ [SØRENSEN und TAAGEHØJ JENSEN 1979] ausgeglichen. Die in der Tränenflüssigkeit enthaltenen Proteine, 6–20 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [BERMAN 1978], bestehen aus Albuminen und Lysozym. Sie spielen beim Entzündungsgeschehen und der Infektabwehr eine Rolle [HANKIEWICZ und SWIERCZEK 1974, ENSINK und VAN HAERINGEN 1977] und unterstützen die pH-Regulation.

Der Augapfel selbst besteht aus konzentrisch angeordneten Gewebsschichten und ist nahezu kugelförmig. Von außen sind nur die stärker als der Rest des Augapfels gekrümmte durchsichtige Hornhaut (Cornea) und die angrenzenden Teile der Lederhaut (Sklera) zu sehen. Die Versorgung des Auges erfolgt durch insgesamt 12 Nerven, darunter sind vier Hirnnerven und eine Reihe verschiedener sympathischer Fasern. Die vier Hirnnerven besitzen ihren Ausgangspunkt direkt im Gehirn und nicht im Bereich des Rückenmarks. Die Blutversorgung erfolgt über die Augenhöhlenschlagader (Arteria ophthalmica). Neben der Versorgungsfunktion haben die Gefäße der Aderhaut (Chorioidea) im Bereich der Rezeptorzellen mit ihrem hohen Blutminutenvolumen die Aufgabe, die Temperaturkonstanz der Netzhaut (Retina) sicherzustellen.

Für den Sehvorgang selbst enthält die Retina drei Typen von lichtempfindlichen Zellen, ca. 6 Mio. Zapfen, ca. 120 Mio. Stäbchen [HUBEL 1989, THEWS et al. 1999] und die erst seit kurzem bekannten melanopsinhaltigen retinalen Ganglion-Zellen [HATTAR et al. 2002]. Die Funktion der Zapfen für das Farbsehen und der Stäbchen für das Hell-Dunkel-Sehen ist schon seit langem bekannt. Die retinalen Ganglion-Zellen hingegen sind Gegenstand der neuesten Forschung. Wahrschein-

lich über Melanopsin als photosensitives Pigment synchronisieren bzw. modulieren sie den circadianen Schrittmacher im Gehirn, den Nukleus suprachiasmaticus im Hypothalamus, mit dem realen Tag-Nacht-Rhythmus [DAVID et al. 2002]. Die Bedeutung der retinalen Hell-Dunkel-Wahrnehmung für den circadianen Rhythmus findet in den retinalen Ganglion-Zellen ihren Ausgangspunkt.

Die Sclera ist die dem Auge formgebende Bindegewebskapsel. Sie besteht aus einem dichten Geflecht kollagener Fasern, die netzartig gegeneinander versetzt laufen. Dies garantiert eine hohe Festigkeit und die für eine einwandfreie optische Abbildung notwendige Formstabilität.

An der Vorderseite des Auges geht die Sklera in die Cornea über. Deren Durchsichtigkeit wird von mehreren Faktoren bestimmt. Die Cornea besitzt keine Blutgefäße, die vorhandenen Epithelschichten sind unverhornt und das Stroma besteht aus regelmäßig angeordneten Lamellen kollagener Fasern, in die eine glykoproteinreiche Kittsubstanz eingelagert ist. Das Fehlen von Blutgefäßen macht eine Versorgung der Cornea durch Diffusion notwendig. Die Versorgung mit den erforderlichen Nährstoffen sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten erfolgen über das Kammerwasser, die Tränenflüssigkeit und die arteriellen Gefäße am Rand der Cornea [THEWS et al. 1999]. Auch die notwendige Sauerstoffversorgung geschieht durch Diffusion, im Falle geöffneter Augenlider direkt durch den Sauerstoff aus der umgebenden Atmosphäre, bei geschlossenen Lidern durch Diffusion vorrangig aus den Blutgefäßen an der Innenseite der Augenlider. Die Cornea weist einen fünfschichtigen Aufbau auf (Abb. 3.2).

Der Durchmesser der Cornea beträgt $\approx 11,5$ mm und eine zur Mitte hin zunehmende Dicke von 0,5–0,7 mm. Die äußerste Schicht ist das Corneaepithel, ein nach außen durch flache Deckzellen mit Mikrovilli, nach innen durch stufenförmige Basalzellen begrenztes, ca. sechs Zellschichten dickes Plattenepithel mit einer Dicke von $\approx 50 \mu\text{m}$. Das Epithel gilt als Hauptbarriere der Cornea gegenüber Wasser und hydrophilen Substanzen; die engen Interzellularräume schränken das Eindringen von Substanzen mit einer Molekülmasse über 1000 ein [MITRA 1993]. Die Trennung von Epithel und Stroma erfolgt durch die Bowman'sche Membran. Das Stroma besteht zu 70 % aus Wasser und trägt zu ca. 90 % an der Gesamtmasse der Cornea bei. Die Descemet'sche Membran begrenzt das Stroma nach innen. Als innerste Zellschicht schließt sich das Endothel an, ein Mono-

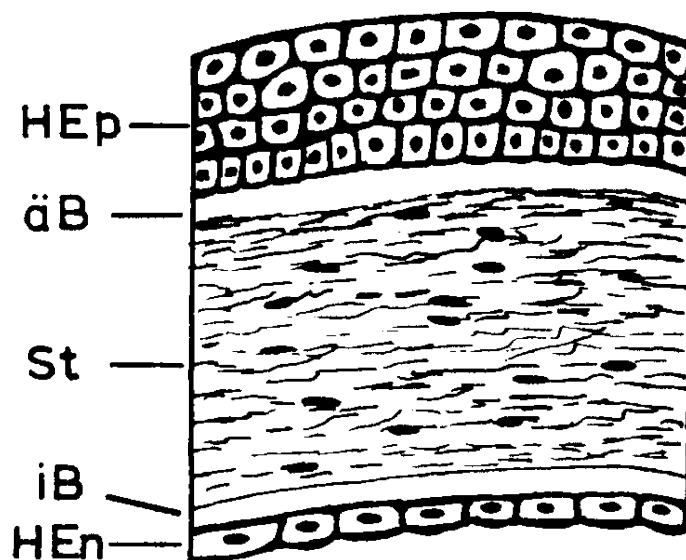


Abbildung 3.2: Schichtaufbau der Cornea [PFEIFER et al. 1995]: HEp Hornhautepithel, äB äußere Basalmembran, St Stroma, iB innere Basalmembran, HEn Hornhautendothel

layer abgeflachter Zellen, welche hauptverantwortlich für die Hydratisierung des Stromas sind. Das Stroma befindet sich im Zustand einer relativen Dehydratisierung [OHRLOFF 1987]. Bedingt durch Kollagen, Mucopolysaccharide und Elektrolyte ist es daher hyperton, wodurch der passive interzelluläre Einstrom von Wasser gefördert wird. Den Wassergehalt regulieren Endothel und Epithel durch aktiven Ionentransport [KLYCE und CROSSON 1985, WIGHAM et al. 1996].

Im Übergangsbereich von Sklera zu Cornea liegt an der Innenseite des Auges der Schlemm'sche Kanal, durch den der Großteil des Kammerwassers aus der vorderen Augenkammer nach Passage des Trabekelnetzwerkes abfließt. Der Schlemm'sche Kanal ist ein ringförmiges Gefäß, welches das Kammerwasser zur Vene hin ableitet. Die Abflussmenge ist im Normalfall gleich der produzierten Kammerwassermenge, so dass sich ein Gleichgewicht mit einem Druck von 10–21 mm Hg einstellt. Der intraokulare Druck (IOP) verhindert, dass sich der gesamte Ziliarkörper sich bei nicht kontrahiertem Ziliarmuskel nach vorn, d. h. ventral, zum Linsenrand hin, verlagern kann und hält durch diesen hydrostatischen Druck den Aug bulb us in seiner Form.

Gebildet wird das Kammerwasser in den Epithelzellen des Ziliarkörpers. Es wird als Ultrafiltrat (proteinarme Flüssigkeit) aus dem Kapillarblut abgepresst. Von der hinteren Augenkammer fließt es über den Irisrand durch die Pupillenöffnung in die vordere Augenkammer. Von dort verlässt das Kammerwasser über das Trabekelnetzwerk und den Schlemm'schen Kanal, durch Rückdiffusion sowie über den uveo-skleralen Abfluss und spezielle Venolen die Augenkammer.

3.1.3 Enzymsysteme des Auges

Sowohl im menschlichen Auge als auch in den okularen Geweben von häufig für Forschungszwecke eingesetzten Tieren (Kaninchen, Rind, Schwein und Ratte) wurde ein großes Spektrum von Enzymsysteme gefunden. Die Enzyme liegen in unterschiedlicher Aktivität in allen okularen Geweben [COUPLAND et al. 1993b, COUPLAND et al. 1994, SHIONO et al. 1986] und dem Tränenfilm [HOCKWIN 1985a, HART 1992] vor.

Damit können prinzipiell alle im Folgenden genannten Phase-I- und Phase-II-Reaktionen ablaufen:

3.1.3.1 Phase-I-Reaktionen (Funktionalisierung)

1. Oxidationen

- aliphatische und aromatische Hydroxylierungen
- Epoxidierung von Doppelbindungen
- Oxidation von Heteroatomen, Alkoholen, Aldehyden
- oxidative Dealkylierung, Desaminierung, Desulfonierung
- Oxidation von Phenolen zu Chinonen
- Aromatisierung von alizyklischen Verbindungen

2. Reduktionen

- Reduktion von Aldehyden, Ketonen, Chinonen, Kohlenstoff-Mehrfachbindungen

- Reduktion von Nitro- und Azogruppen, N-Oxiden, Disulfiden und Sulfoxiden, Arsen-V- zu Arsen-III-Verbindungen
- reduktive Dehalogenierung
- Dehydroxylierung von Alkoholen und Phenolen

3. Hydrolysen

- Hydrolyse von Carbonsäureestern, Carbamaten, Glykosiden
- Hydrolyse von Amiden, Imiden, Nitrilen, Epoxiden, Aziridinen
- hydrolytische Dehalogenierung

3.1.3.2 Phase-II-Reaktionen (Konjugationen)

1. Glucuronsäure-Konjugationen

2. Aminosäure-Konjugationen

- Glycin-Konjugation (Hippursäure-Synthese)
- Ornithursäure-Synthese
- Glutamin-Konjugation
- Mercaptursäure-Synthese (Glutathion-Konjugation)
- Arginin-, Serin-, Taurin, Peptid-Konjugation

3. Schwefelsäure-Konjugation (Sulfatierung)

4. Methylierung, Hydroxymethylierung, Methylthionierung

5. Essigsäure-Konjugation (Acetylierung)

6. Thiocyanatbildung (Cyanid-Entgiftung)

3.1.3.3 Phase-I-Enzyme

Cytochrom P450: Die Cytochrom P450 (CYP) Monooxygenasen sind die bedeutendste Einzelgruppe innerhalb der Phase-I-Enzyme. Das mikrosomale Enzymsystem setzt sich aus verschiedenen Einheiten, dem Hemoprotein Cytochrom

P450, einem Flavinprotein, der NADPH-CYP(c)-Reduktase und einem Phospholipid zusammen [SCHWARTZMAN und ABRAHAM 1990]. CYP ist eine große Gruppe von Enzymen, die sich in verschiedene Isoformen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten aufteilt. Es werden sowohl endogene als auch exogene Substrate metabolisiert. Beim Menschen sind eine Vielzahl der dreißig bekannten Unterfamilien von CYP vertreten (CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4) [WRIGHTON und STEVENS 1992, FORD et al. 1996]. Die Produkte sind gewöhnlich polarer als ihre Substrate und machen sie daher zugänglicher für die folgenden Phase-II-Reaktionen oder die Elimination aus dem Organismus. Erstmals konnte Shichi die Anwesenheit von CYP im Rinderauge nachweisen [SHICHI 1969]. Schwartzman et al. untersuchten die biologische Aktivität von CYP mit verschiedenen Markern in den einzelnen Geweben des Auges [SCHWARTZMAN et al. 1987]. Der Ziliarkörper und das pigmentierte Netzhautepithel zeigten, mit Ausnahme der Bildung biologisch aktiver Metaboliten der Arachidonsäure, die höchste Aktivität. Abraham et al. identifizierten als Erste die NADPH-Cytochrome-P450(c) Reduktase im humanen Corneaepithel und bestimmten eine Aktivität von 20 % im Vergleich zur humanen Leber [ABRAHAM et al. 1987].

Flavinhaltige Monooxygenasen: Flavinhaltige Monooxygenasen (FMO) katalysieren Sauerstoff- und NADPH-abhängige Oxidationen einer großen Reihe von Substanzen [ZIEGLER 1988]. Die Rolle von FMO an der gesamten Aktivität der Monooxygenasen im Stoffwechsel des Auges ist bisher nicht eindeutig bestimmt.

Monoaminoxidasen: Monoaminoxidasen (MAO) katalysieren die Oxidation von endogenen und exogenen Aminen. Zwei Isoformen, MAO-A und MAO-B, sind bekannt. MAO sind in den Mitochondrien lokalisiert und für den Abbau der Neurotransmitter vom Catecholamintyp zuständig. Die MAO-Aktivität wurde in vielfältiger Weise beschrieben. Im Kaninchenauge wurde die Aktivität zuerst im Iris-Ziliarkörper gefunden [KRISHNA et al. 1961, SHANTAVARAPPA und BOURNE 1964]. Waltman et al. fanden beim Kaninchen eine Aktivität von 55 % im Iris-Ziliarkörper und von 16 % in der Retina/Choroid im Vergleich zum Lebergewebe [WALTMAN und SEARS 1964]. Gawienowski et al. bestimmten am Augengewebe vom Schaf mit Hilfe des Modells substrates Tyramin in vitro eine Rangfolge

der Aktivität der verschiedenen Gewebetypen: Ziliarkörper > Netzhaut > Trabekelnetzwerk > Choroid > Iris [GAWIENOWSKI et al. 1982]. Die MAO-Aktivität führt zum Abbau verschiedener Arzneistoffe. Beschrieben ist dies für die Oxidation verschiedener β -Blocker (Propranolol, Timolol, Alprenolol) [BENEDETTI et al. 1988] und Dipivefrin [ANDERSON et al. 1980].

Hydrolasen (Lysosomale Enzyme): Lysosomale Enzyme sind saure Hydrolasen, beladen mit Lysosomen [COUPLAND et al. 1993b]. Proteine, Glucosamine, Nukleinsäuren, Fette und andere Biomoleküle werden durch Hydrolasen abgebaut. Im Auge wurden in vielen Geweben, u. a. im pigmentierten Retinaepithel, im Ziliarkörper, in der Iris, der Cornea und der Konjunktiva, 13 verschiedene Hydrolasen gefunden, darunter die saure Phosphatase, die β -Glucuronidase, die Arylsulfatase, die saure Lipase, die Dipeptidyl-Peptidase und die Aminopeptidase [HAYASAKA 1983, COUPLAND et al. 1993b]. Für die Aminopeptidase bestimmten Stratford et al. in der Kaninchencornea und -konjunktiva eine Aktivität von 5–15 % im Vergleich zur Ileum-Aktivität [STRATFORD JR. und LEE 1985]. Die Hydrolasen spielen bei verschiedenen Augenerkrankungen eine Rolle, z. B. beim Glaukom [HAYASAKA 1983].

Esterasen: Das typische Substrat dieser Enzymklasse sind Carboxylester. Lee et al. untersuchten die Aktivitäten an den Geweben von Kaninchen- und Rinderaugen [LEE et al. 1982-83, LEE 1983, LEE et al. 1985]. Die Esteraseaktivität im Rinderauge ist hauptsächlich mikrosomaler Natur [LEE et al. 1982-83], mit den höchsten Aktivitäten im Iris-Ziliarkörper und im cornealen Epithel. Im Gegensatz zur Dominanz des Carboxylesterase-Systems der Leber wird die Aktivität der Esterasen im Auge hauptsächlich durch die Butyrylcholinesterase bestimmt [LEE et al. 1985]. Eine Reihe von Arzneistoffen wird durch die Esterasen des Auge metabolisiert, darunter Dexamethason-Valerat [TANIGUCHI et al. 1988], Prednisolon-Succinat [TSUJI et al. 1987], Acetylsalicylsäure [VALERI et al. 1989] und Pilocarpin [ELLIS et al. 1972]. Auch das Prodrug Dipivefrin wird durch die Esterasen des Auges zu seiner Wirkform, dem Epinephrin, metabolisiert, wobei der Hauptanteil der Hydrolyseleistung im Auge auf die Cornea entfällt [ANDERSON et al. 1980]. Die Fähigkeit des okularen Gewebes, Esterbindungen zu spalten, hat neben DPE zu weiteren Ester-Prodrug-Entwicklungen geführt, z. B.

Pilocarpin-Prodrugs [BUNDGAARD et al. 1986], Tropanalkaloid-Prodrugs [KUMAR et al. 1993b, KUMAR et al. 1993a].

Ketoreduktasen: Ketone werden durch ein NADPH-abhängiges Enzym im Cytosol der Zellen reduziert. Aus pharmazeutischer Sicht ist die Reduktion des Antiglaukomatousums Levobunolol zu seinem aktiven Dihydroxymetaboliten von Bedeutung [TANG-LIU et al. 1987]. Die höchste Aktivität wurde bei Untersuchungen am Kaninchenauge im cornealem Epithel gefunden [LEE et al. 1988]. Bodor et al. konnten eine stereospezifische Funktion des Enzyms u. a. am Adrenalin nachweisen [BODOR und VISOR 1984, BODOR und PROKAI 1990].

Aldosereduktase: Die Aldosereduktase vermittelt die Umwandlung von Glucose über Sorbitol in Fructose. Bei einem Überangebot von Glucose bei einer bestehenden diabetischen Erkrankung führt dieser Weg zu einer Anreicherung von Sorbitol in den Zellen und trägt so zur Ausbildung der diabetischen Retinopathie und zur Kataraktbildung bei [SATO et al. 1993]. Selbige Untersuchung lokalisierte die Aldosereduktase im menschlichen Auge im pigmentierten Retinaepithel.

Aldehydoxidase: Das molybdän- und eisenhaltige cytosolische Enzym oxidiert N-heterocyclische Verbindungen und Aldehyde. Shimida et al. haben die Aldehydoxidase aus Rinder- und Kaninchenauge isoliert und Substrate (Sulindac, Chloramphenicol) bestimmt [SHIMADA et al. 1989b, SHIMADA et al. 1988, SHIMADA et al. 1989a, SHIMADA et al. 1987].

3.1.3.4 Phase-II-Enzyme

Glutathionkonjugation: Es wird eine Thioesterverbindung zwischen dem Tripeptid Glutathion (GTH) und dem elektrophilen Zentrum einer Verbindung hergestellt. Die Glutathionkonjugate werden entweder direkt oder nach Umwandlung in Mercaptursäure-Derivate ausgeschieden. Diese Reaktion wird durch das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) katalysiert oder läuft spontan ab. Im Rinderauge konnten alle notwendigen Enzyme für die Mercaptursäurebildung aus Arzneistoffen gefunden werden [SANETO et al. 1982b]. Die höchsten Aktivitäten

in okularen Geweben wurden im Ziliarkörper, der Retina und der Cornea gemessen [SANETO et al. 1982a]. GST ist eine große Familie von Enzymen — im Rinderauge konnten mehrere Isoformen (α , μ , π) isoliert werden [AHMAD et al. 1988].

UDP-Glucoronyltransferase: UDP-GT vermittelt die Konjugation von Substraten mit dem Co-Faktor UDP-Glucuronsäure (UDP-GA). Vier Typen von Glucuronidierungen können gezeigt werden: die O-, die S-, die N- und die C-Form. UDP-GT ist ein membrangebundenes Enzym mit verschiedenen Isoformen. Im Rinderauge wurde eine hohe Aktivität im Iris-Ziliarkörper beschrieben [DAS und SHICHI 1981]. Im Kaninchenauge wurde die Aktivität mit verschiedenen Substraten nachgewiesen und in allen Geweben außer der Cornea gefunden [WATKINS III. et al. 1991].

Acetyltransferase: Durch die Acetyltransferase wird die Übertragung einer Acetylgruppe einer endogenen Verbindung (z. B. Coenzym A) auf Substrate mit Hydroxyl-, primären Amino- und Sulfhydryl-Gruppen katalysiert [WEBER et al. 1990]. Diese Reaktion kann zur Bildung mutagener oder kanzerogener aromatischer Amine und Hydrazine führen. Es wird zwischen „schnellen“ und „langsamen“ Acetylierern unterschieden. N-Acetyltransferase-Aktivitäten sind sowohl für Rinderaugen [SHICHI und NEBERT 1982, GAUDET und CHADER 1992] als auch für Kaninchenaugen [WATKINS III. et al. 1991, CAMPBELL et al. 1991] beschrieben worden.

Sulfotransferase: Das cytosolische Enzym Sulfotransferase überträgt Sulfatreste von Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat auf ein Substrat [MULDER und JACOBY 1990]. Die Übertragung ist ein wichtiger Stoffwechselweg für Substanzen mit phenolischen, alkoholischen oder Hydroxylamin-Gruppen. Im humanen Stoffwechsel ist dies für adrenerge Arzneistoffe, wie Propranolol und Albuterol, von Bedeutung. Das Enzym wurde beim Kaninchen in der Cornea, dem Iris-Ziliarkörper, dem Choroid und der Netzhaut nachgewiesen; die höchste Aktivität wurde in der Cornea mit 31 % der Leberaktivität gefunden [WATKINS III. et al. 1991].

Epoxidhydrolase: Die Epoxidhydrolase (EH) wandelt Epoxide in Diole um. Es sind zwei Hauptklassen der EH bekannt: die mikrosomale EH (mEH) und die cytosolische EH (cEH). Die Aktivität ist gering und am sonst so stoffwechselaktiven Kaninchenauge konnte keine Aktivität von EH nachgewiesen werden [WATKINS III. et al. 1991].

O-Methyltransferasen: Der wichtigste Vertreter ist die Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Zusammen mit dem Methylgruppen-Überträger S-Adenosylmethionin wird durch COMT die Bildung adrenerger Neurotransmitter katalysiert, S-Adenosylmethionin liefert die Methylgruppe für diese Reaktion. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind die Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HOMT) und die Protein-Carboxy-O-Methyltransferase. Beim Menschen zeigt die cytosolische COMT verschiedene Isoformen, und eine Reihe von Arzneistoffen dienen als Substrat (Isoprenalin, Propranolol, Dobutamin und α -methyl-DOPA). COMT methyliert Isoproterenol in vitro in der Kanincheniris [PATIL und TRENDLENBURG 1982]. HOMT-Aktivität wurde in den okularen Geweben von Ente [CARDINALI und ROSNER 1972] und Kaninchen [NOWAK et al. 1993] nachgewiesen. Bausher und Sears fanden in vivo am Kaninchen Effekte eines COMT-Inhibitors auf den Metabolismus von Epinephrin [BAUSHER und SEARS 1976]. Sie vermuteten eine potentielle Anwendungsmöglichkeit für die nachgewiesene Inhibition des Epinephrin-Abbaus im Auge auf den hypotensiven Effekt.

N-Methyltransferasen: Durch diese Gruppe von Enzymen wird die Übertragung von Methylgruppen von S-Adenosyl-L-Methionin auf eine Aminogruppe katalysiert. Es existieren drei Hauptgruppen, die Phenolethanolamin N-Methyltransferasen, die Histamin N-Methyltransferasen und die Amin Methyltransferase. Die Histamin N-Methyltransferase wurde von Nowak et al. [NOWAK und SOCKO 1988] im okularen Gewebe von Rindern, Kaninchen und Menschen identifiziert.

3.1.3.5 Esteraseaktivität im Auge

Die Gesamtesteraseaktivität im Auge lässt sich auf verschiedene Enzyme zurückführen. Eine erste Charakterisierung führte zu der Unterscheidung nach Cholin-

esterasen (ChE), Carboxylesterasen und den unspezifischen Esterasen [NAKAMURA et al. 1993a, LEE et al. 1982-83]. Hinsichtlich der räumlichen Verteilung der Esterasen in den verschiedenen Kompartimenten des Auges und in den Fraktionen des aufgearbeiteten Gewebes ergab sich sowohl für den Menschen [COUPLAND et al. 1994, GONDHOWIARDJO et al. 1991], als auch für das Kaninchen [REDELL et al. 1983, LEE et al. 1985, LEE et al. 1982, LEE 1983], für Rinder [LEE et al. 1982-83, DOUGHTY 1996, HAYASAKA 1974] und Schweine [COUPLAND et al. 1994] ein ähnliches Bild; für Arzneistoffe als Substrate s. Kap. 3.1.3.3. Die Gewebe höchster Esteraseaktivität waren das Corneaepithel und der Iris-Ziliarkörper. Hauptträger der Aktivität ist die Mikrosomenfraktion.

Die Hauptaktivität der Esterasen beim Kaninchen liegt bei den Cholinesterasen, und in dieser Gruppe mit $\approx 75\%$ bei der ButChE [LEE et al. 1985]. Die Esterasen im Auge, die u. a. auch für die Abspaltung der Pivalylsäurereste des Dipivefrins verantwortlich sind, werden von DPE konzentrationsabhängig in ihrer Aktivität gehemmt [NAKAMURA et al. 1993a]. Diese Hemmung führt auch nach Dauerapplikation dieses Arzneistoffes über vier Wochen nicht zu einer Verminderung der Esteraseaktivität [NAKAMURA et al. 1993b].

3.1.4 Das Glaukom

3.1.4.1 Pathologie

Das Glaukom ist eine verbreitete und gut bekannte Erkrankung des Auges. Die wichtigste und häufigste Ursache des Glaukoms, auch „Grüner Star“ genannt, ist eine pathologische Steigerung des intraokularen Drucks (IOP) auf >21 mm Hg, die okuläre Hypertension. Auslöser für den steigenden Kammerwasserdruck ist ein Missverhältnis von Kammerwasserproduktion und -abfluss, wobei nicht die Überproduktion, sondern die Abflussstörung alleinige Ursache des Druckanstiegs ist. Von einem primären Glaukom spricht man, wenn dem Glaukom keine weitere Erkrankung des Auges vorausgeht. Ein Glaukom als Folge einer vorausgegangenen anderen Augenerkrankung, z. B. einer Infektion, einer Entzündung oder einer Verletzung, aber auch als Folge bestimmter Medikamente wird als sekundäres Glaukom bezeichnet.

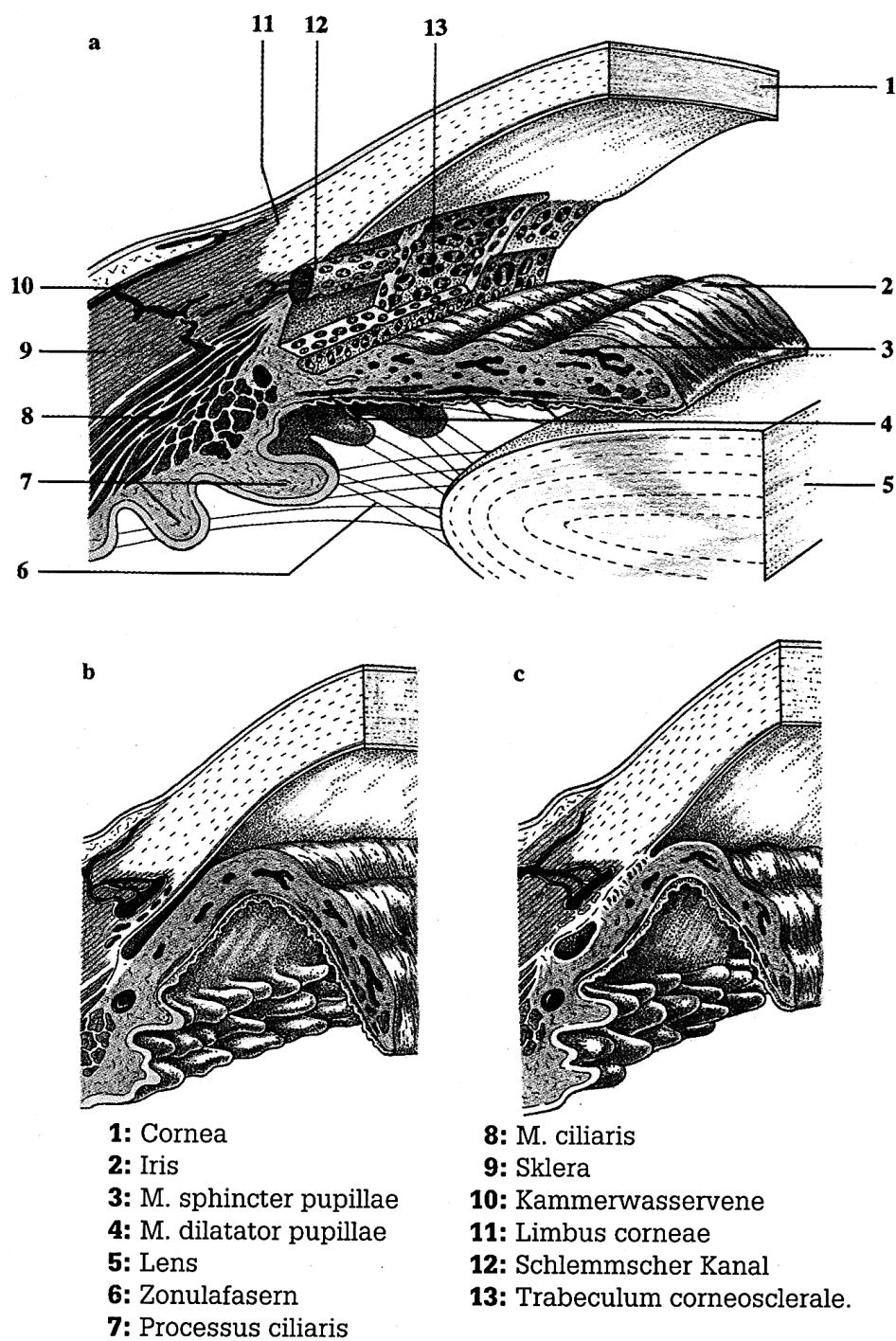


Abbildung 3.3: Normaler (a), enger (b) und verschlossener (c) Kammerwinkel,
Abb. aus [BECK und LANGEHAGE 1995]

Nach der Weite des Kammerwinkels (Abb. 3.3 S. 31) wird weiterhin in Offenwinkel- und Winkelblockglaukom unterteilt. Beim Offenwinkelglaukom steigt der IOP durch einen verminderten Kammerwasserabfluss, der durch strukturelle Veränderungen des Trabekelnetzwerkes hervorgerufen wird. Beim Winkelblockglaukom wird der natürliche Abflussweg durch einen verengten oder verschlossenen Kammerwinkel mechanisch behindert.

Die Erkrankung verläuft in den meisten Fällen anfangs symptomlos. Die Ausnahme bildet das akute Winkelblockglaukom, das durch einen schnellen Anstieg des IOP auf bis zu 70 mm Hg gekennzeichnet ist, und dadurch von starken Augenschmerzen, aber auch von Kopfschmerzen, Erbrechen und Krämpfen begleitet wird.

Die relativ harte Cornea und Sklera, die den Augensbulbus bilden, können einem sich erhöhenden Druck mechanisch nicht nachgeben, gleichzeitig ist das Kammerwasser inkompressibel. So bestimmen der effektive Filtrationsdruck in den Kapillaren und der Abflusswiderstand den IOP. Dies bedeutet, selbst wenn der Druck den Normalwert überschreitet, ändert sich das Volumen des Bulbus kaum, es bleibt konstant. Der Druckanstieg bewirkt eine mangelnde Durchblutung der im Inneren gelegenen Kapillaren. Die Folge sind Sauerstoffmangel und Schädigung der Netzhaut und des Sehnervs an der Austrittsstelle aus dem Bulbus (Störung der Mikrozirkulation). Durch den ständig erhöhten IOP kommt es daher langfristig am Sehnerv und der Netzhaut zu einer Schädigung, die über eine starke Beeinträchtigung des Sehvermögens unbehandelt bis zur Erblindung führen kann.

3.1.4.2 Medikamentöse Behandlung

Allgemeine Bemerkungen Alle bekannten Arzneimittel in der Glaukomtherapie haben eine deutliche und lang anhaltende Senkung des IOP zum Ziel. Die verwendeten Wirkstoffe nutzen über verschiedene Angriffspunkte (Abb. 3.4) am Auge letztendlich zwei Prinzipien, um eine Drucksenkung im Auge hervorzurufen. Ein Weg ist die Verbesserung des Kammerwasserabflusses. Beim Offenwinkelglaukom wird dies durch eine Veränderung des Trabekelnetzwerkes oder Senkung des episkleralen Venendruckes erreicht. Beim verengten oder verschlossenen

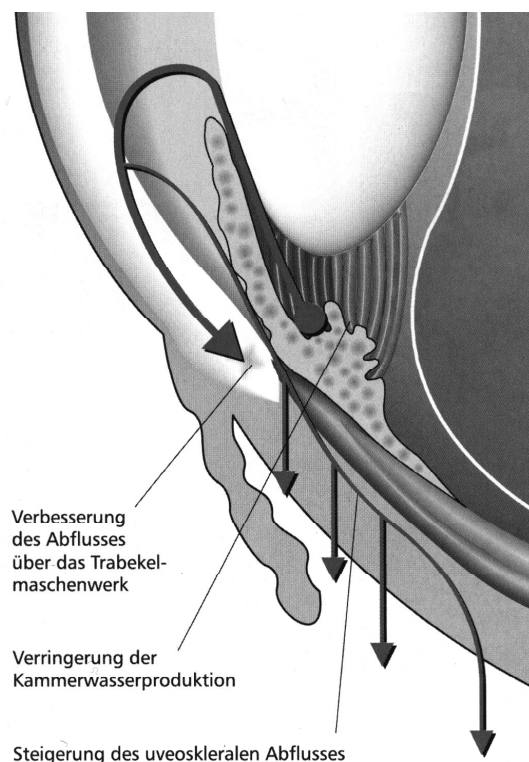


Abbildung 3.4: Therapeutische Ansatzpunkte bei der Glaukombehandlung [SCHMIDT 2000]

Kammerwinkel ist das Ziel der Behandlung die Beseitigung der mechanischen Behinderung des Abflussweges. Ein weitere Möglichkeit, das Auge zu entlasten, ist die Drosselung der Kammerwasserproduktion durch einen direkten Eingriff in die Kammerwasserbildung oder durch eine Verringerung der Perfusion des Ziliarkörpers.

Parasympathomimetika Pilocarpin, als Base, Nitrat und Hydrochlorid pharmazeutisch verwendet, ist ein direktes Parasympathomimetikum. Pilocarpin erregt direkt die postganglionären, cholinergen Rezeptoren, welche physiologischerweise durch Acetylcholin innerviert werden. Der direkte Angriff an den Muskelzellen des Sphinkter pupillae führt zur Miosis, der Angriff an den Ziliarmuskeln zu einem Akkomodationsspasmus. Die dadurch erfolgende Erweiterung des Kammerwinkels führt zu einer Verbesserung des Abflusses und einer damit verbundenen Drucksenkung. Außerdem erfolgt durch die medikamentös bedingte Nahakko-

modation ein Auseinanderziehen des Trabekelnetzwerkes, wodurch eine leichtere Passage des Kammerwassers erreicht wird. Carbachol entfaltet nach dem selben Mechanismus seine Wirkung.

Physostigmin und Neostigmin sind Cholinesterasehemmer. Durch ihre Wirkung wird der Abbau des natürlicherweise vorkommenden Acetylcholins gehemmt und somit eine Wirkungsverlängerung und -verstärkung des vorhandenen Neurotransmitters an den Rezeptoren hervorgerufen.

β -Blocker In der Roten Liste sind verschiedene β -Blocker [u. a. Timolol, Metipranolol, Levobunolol und Betaxolol] aufgeführt, die als Einzelpräparate und in Kombination mit Substanzen anderer Wirkstoffklassen verwendet werden [ROTE LISTE 2002]. Die Substanzen bewirken über eine Senkung der Kammerwasserproduktion eine Reduktion des IOP. Der Mechanismus beruht wahrscheinlich auf einer Blockade von vornehmlich β_2 -Rezeptoren an den Blutgefäßen zur Versorgung des Ziliarkörpers als auch im Ziliarepithel. Dadurch kommt es zu einer Verminderung der Zufuhr von Blut, welches als Substrat für das zu bildende Kammerwasser dient [MÜLLER-BOHN 1996].

Sympathomimetika Die lokal angewendeten Sympathomimetika verbessern durch eine Senkung des episkleralen Venendruckes den Kammerwasserabfluss; gleichzeitig vermindern sie durch eine Verengung der Blutgefäße die Ziliarkörperperfusion und senken so die Produktion von Kammerwasser. Dabei ist die Wirkung, je nach Rezeptoraffinität der Wirkstoffe, unterschiedlich. α_2 -Agonisten wie Brimonidin (Alphagan®), Apraclonidin (Iopidine®) und Clonidin (Isoglaucan®) vermindern die Kammerwasserbildung. $\alpha_{1,2}$, $\beta_{1,2}$ -Agonisten wie Epinephrin, Dipivefrin (d Epifrin® 0,1 %, Glaucothi® 0,1 %) und Phenylephrin verbessern zusätzlich den Kammerwasserabfluss. Dies erfolgt über eine Veränderung im Trabekelnetzwerk, die erst allmählich im Laufe der Therapie eintritt.

Carboanhydrasehemmer Carboanhydrasehemmer werden bei erhöhtem IOP sowohl systemisch als auch lokal eingesetzt. Sie bewirken eine Reduktion des IOP durch eine Verminderung der Kammerwasserproduktion. Erreicht wird dies durch

Hemmung des fast ausschließlich im Auge vorkommenden Isoenzym Carboanhydrase-II. Durch die verlangsamte Bildung von Bicarbonat-Ionen und nachfolgender Reduktion des Natrium- und Wassertransports in den Ziliarfortsätzen des Auges sinkt die produzierte Kammerwassermenge. Acetazolamid (Diamox®) ist das Mittel der Wahl bei einem akuten Glaukomanfall. Systemisch eingesetzt lässt sich damit ein IOP von 70 mm Hg, bei dem die Sehkraft hochgradig gefährdet ist, innerhalb von 30 min auf Werte von 20–30 mm Hg senken. Aufgrund vieler Nebenwirkungen systemischer Carboanhydrasehemmer werden sie nicht zur Dauertherapie verwendet. Als lokal wirksame Medikamente werden Brinzolamid (Azopt®) und Dorzolamid (Trusopt®) sowie eine Kombination von Dorzolamid mit dem β -Blocker Timolol (Cosopt®) verwendet. Durch die lokale Applikation spielen die systemischen Nebenwirkungen kaum eine Rolle.

Prostaglandine Bislang sind drei Wirkstoffe zur Behandlung des Offenwinkelglaukoms und der okulären Hypertension zugelassen. Sie gelangen entweder als Monotherapie oder in Kombination mit Betablockern zum Einsatz. Es handelt sich um das seit fünf Jahren zugelassene PGF₂ α -Analogon Latanoprost (Xalatan®), ein Prodrug, das nach seiner Umwandlung in die freie Säure über die Prostaglandin- Rezeptoren wirkt, um das Isopropylester-Prodrug Travoprost (Travatan®), ein hochselektiver Agonist mit hoher Affinität zum Prostaglandin-FP-Rezeptor, der über die Cornea resorbiert wird und dabei hydrolysiert, und um das 2002 zugelassene Bimatoprost (Lumigan®), ein Prostamid, das die Wirkung der den IOP senkenden körpereigenen Prostamide besitzt und über den in seiner Struktur noch nicht bekannten Prostamid-Rezeptor wirkt. Diese Substanzen verbessern den Abfluss über das Trabekelnetzwerk, den uveoskleralen Abfluss und bewirken eine Senkung des episkleralen Venendruckes. Eine kurze Aufstellung von Angaben über Dosierung, Wirksamkeit, Vergleichsstudien und Nebenwirkungen findet sich bei Brunner [[BRUNNER und GENSTHALER 2002](#)].

3.2 Verwendete Substanzen

Im Folgenden werden die Substanzen bzw. Substanzklassen aufgeführt und betrachtet, die unmittelbar Gegenstand der Untersuchungen waren bzw. deren Ei-

enschaften in den Versuchen eine herausragende Bedeutung zukommt. Alle weiteren Angaben über die sonstigen verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in Anhang C ab Seite 182 zu finden.

3.2.1 Dipivefrin

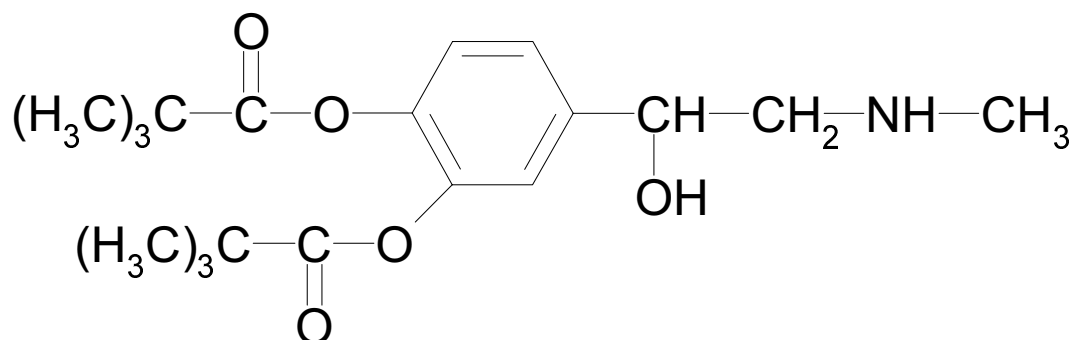


Abbildung 3.5: Dipivefrin, $C_{19}H_{29}NO_5$,
4-[1-Hydroxy-2-(methylamino)-ethyl]-o-phenylen- di-(2,2-Dimethyl-1-oxopropyl)

3.2.1.1 Geschichte

Dipivefrin (Abb. 3.5) ist das 3',4'-Dipivalat des Adrenalins und wurde 1973 und 1978 für Adolf Klinge & Co., München [Henschler, Wagner und Hampel: Ger. pat. 2.152.058; U.S. pat. 4.085.270] und 1974 für die INTERx Research Cooperation, Lawrence (Kansas, USA) [Hussain und Truelove: Ger. pat. 2.343.657; U.S. pats. 3.809.714 and 3.839.584] patentiert. Der Patentschutz wurde für die Synthese, die pharmazeutische Formulierung und die Anwendung als Antiglaukomatosum und Bronchospasmolytikum erteilt. Medizinische Verwendung findet dieser Arzneistoff bisher nur in der Anwendung als Antiglaukomatosum.

3.2.1.2 Synthese

Der Syntheseweg der Erstanmelder hat später durch verschiedene Autoren Veränderungen erfahren: [Zupan: (1983) U.S. pat. 4338455;(1981) Int. pat. 8100849],

[Bodor und Yuan: (1977) U.S. pat. 4035405] und [Maki und Rosenqvist: (1982) Can. pat. 1178605]. Einen beschriebenen Syntheseweg findet man bei Sittig [SITTIG 1988], der auch von Kleeman und Engel wiedergegeben wird [KLEEMAN und ENGEL 1982]. Der Verlauf der Synthese, ausgehend von α -Chlor-3',4'-dihydroxyacetophenon bis zur Bildung und Isolierung des Dipivefrin-Hydrochlorids, ist in kurzer Form in [BRITTAİN 1993] beschrieben und dargestellt.

3.2.1.3 Eigenschaften

Dipivefrin ist ein weißes, kristallines Pulver mit einem Schmelzbereich von 146–147 °C und einer relativen Molekülmasse von 351,44. Pharmazeutische Verwendung findet das Hydrochlorid. Das Dipivefrinhydrochlorid ($M_r = 387,90$) hat einen Schmelzbereich von 158–159 °C. Das UV-Maximum in Wasser liegt bei 263 nm ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 11,8$). Dipivefrinhydrochlorid hat einen p_{ka} -Wert von 9,01 [HAGERS HANDBUCH DER PHARMAZEUTISCHEN PRAXIS 1993]. Eine wässrige Lösung von DPE (1 %) besitzt einen pH-Wert von 4,8 und ist klar, farb- und geruchlos. In Tabelle 3.1 sind die Löslichkeiten von Dipivefrin-Hydrochlorid in verschiedenen Lösungsmitteln angegeben.

Tabelle 3.1: Löslichkeit von Dipivefrin-Hydrochlorid in verschiedenen Lösungsmitteln (aus [BRITTAİN 1993])

Lösungsmittel	Löslichkeit [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]
Wasser	621
Methanol	581
Chloroform	570
Acetonitril	69
Hexan	0,05

Der n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient K_V (Theorie s. 7.2.4.5) muss für ionisierbare Substanzen um die Angabe des pH-Wertes und des Systems zu dessen Einstellung erweitert werden. In Tabelle 3.2 sind verschiedene K_V aufgeführt. Zum Vergleich sind die entsprechenden Koeffizienten des Epinephrins mit aufgeführt, um die veränderten Verteilungsverhältnisse durch die Synthese des Prodrugs Dipivefrin zu verdeutlichen.

Tabelle 3.2: Verteilungskoeffizienten von Dipivefrin und Epinephrin in verschiedenen Systemen (aus [BRITTAIN 1993])

System	Dipivefrin	Epinephrin	Faktor ^{*)}
n-Oktanol/0,1 N Essigsäure (pH 4,0)	0,51	0,0032	159
n-Oktanol/Phosphatpuffer (pH 7,2)	4,89	0,0081	604
Tetrachlorkohlenstoff/Phosphatpuffer (pH 7,2)	1,07	0,0090	119

^{*)} der Faktor gibt die Steigerung des Verteilungskoeffizienten von Dipivefrin im Vergleich zu Epinephrin an

3.2.1.4 Stabilität und Abbau

Als Substanz ist das Dipivefrin-Hydrochlorid sehr stabil. DPE bleibt unter den definierten und verschärften Lagerbedingungen des Langzeitstabilitätstests für den Stresstyp „B“ (Hitze stress) unverändert. Der Hitze stress fordert einen Test über 6 Monate bei 40 °C und bei 75 % relativer Luftfeuchte, der für DPE auf 24 Monate ausgeweitet wurde. In diesem Zusammenhang konnten auch keine praktisch relevanten Polymorphismen festgestellt werden [BRITTAIN 1993].

In wässrigen Lösungen wird die Stabilität durch Hydrolyse der Esterbindungen herabgesetzt. Im sauren pH-Bereich um pH 3 ist eine für die pharmazeutische Verwendung in wässrigen Augentropfen ausreichende Stabilität gegeben. Im neutralen Bereich findet eine deutlich messbare Zersetzung statt. Die höchste Zersetzungsgeschwindigkeit tritt jedoch im alkalischen Bereich auf (s. Abb. 3.6). Ein bevorzugter Abbau über 3- oder 4-Monopivalylepinephrin tritt nicht auf, ebenso wenig eine Anreicherung der Monoester [WALL et al. 1992].

Nach Freisetzung des Epinephrins beginnt dessen Abbau, der unter Sauerstoffeinfluss zu intensiv gefärbten Produkten führt. In Abbildung 3.7 ist der Abbauweg des Epinephrins bis zum intensiv rot gefärbten Adrenochrom dargestellt. Der weitere Abbau erfolgt hauptsächlich über eine Isomerisierung zu Adrenolutin und die Bildung weiterer Oxidationsprodukte. Dem schließt sich eine Autopolymerisation (Melanisierung) an, die zu einem braunschwarzen Niederschlag führt.

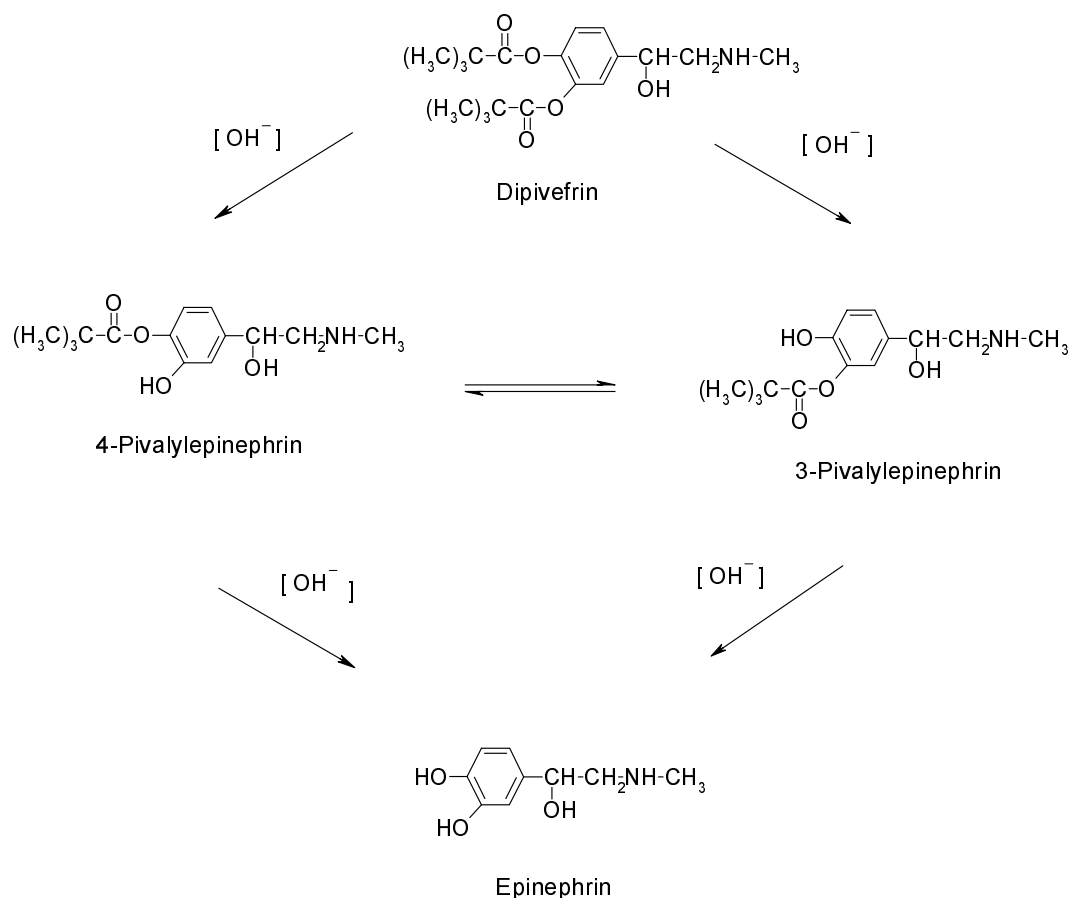


Abbildung 3.6: Hydrolyse vom Dipivefrin im alkalischen Milieu

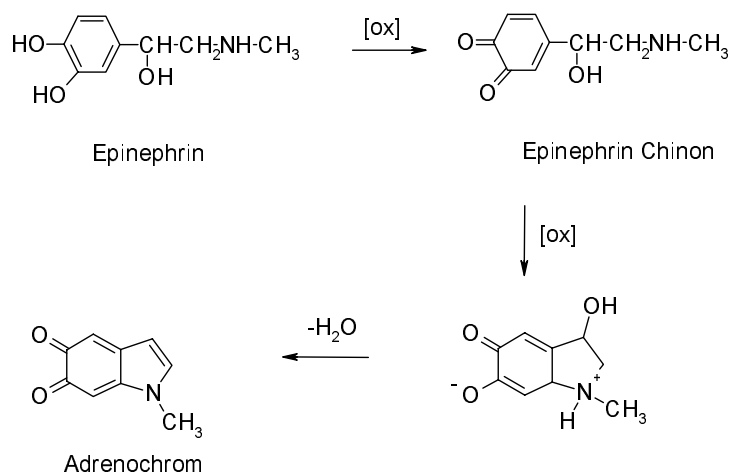


Abbildung 3.7: Abbau von Epinephrin

3.2.1.5 Pharmakologie

Dipivefrin ist ein Sympathomimetikum mit direkter Wirkung auf die $\alpha_{1,2}$, $\beta_{1,2}$ -Rezeptoren. Membranbindungsstudien an Iris und Ziliarkörper des Kaninchenauges zeigen eine vergleichbare Bindungstendenz an die α - und β -Rezeptoren [NEUFELD und PAGE 1977, INNEMEE und VAN ZWIETEN 1982]. Die lokale Applikation am Auge verursacht eine Vasokonstriktion und eine geringe Pupillenerweiterung. Durch die Verengung der Blutgefäße wird die Ziliarkörperperfusion verringert und so die Produktion von Kammerwasser reduziert. Sympathomimetika bewirken durch eine Senkung des episkleralen Venendruckes eine Verbesserung des Kammerwasserabflusses [GOLDBERG et al. 1980, MUTSCHLER 1991].

Dipivefrin als Prodrug des Epinephrins verbessert wie dieses zusätzlich den Kammerwasserabfluss über eine strukturelle Veränderung im Trabekelnetzwerk, die erst allmählich im Laufe der Therapie eintritt [THIEL 1970]. Einflüsse auf die Morphologie und die miotische Aktivität des humanen Trabekelnetzwerkes wurden bereits für Epinephrin beschrieben [TRIPATHI und TRIPATHI 1984]. Möglicherweise sind auch die durch Dipivefrin in vitro hervorgerufene Wachstumshemmung der Keratozyten des Trabekelnetzwerkes und der Endothelzellen [SAMPLES et al. 1989] und der Einfluss in Richtung auf eine gesteigerte Hydrolaseaktivität des Trabekelnetzwerkes glaukomatöser Augen dafür verantwortlich [COUPLAND et al. 1993a]. Diese Wirkungen führen zu der von Kawa elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Verringerung der Zelldichte und einer Kondensation der Zytoskelettfasern im Trabekelnetzwerk [KAWA et al. 1993]. Dipivefrin, als Prodrug des Epinephrins, erhöht wie dieses die Aktivität der Cl^- -Carrier in den Epithelzellen [KLYCE et al. 1973, KLYCE und WONG 1977].

Die therapeutische Breite von Dipivefrin liegt im Bereich von 0,005–0,5% [KABACK et al. 1976]. Vergleichende Studien mit Epinephrin bescheinigen Dipivefrin eine höhere Wirksamkeit nach lokaler Applikation mit weniger Nebenwirkungen [MCCLURE 1974, EISENBURGER et al. 1981]. Die systemischen Effekte von Dipivefrin, insbesondere kardiovaskulärer Art, entsprechen qualitativ annähernd denen von Epinephrin, wobei sie etwas später einsetzen und länger anhalten [WANG et al. 1977]. Das spricht dafür, dass erst die hydrolytische Abspaltung der Pivalylsäure erfolgen muss und dass nur das freie aktive Catecholamin Epinephrin für die Wirkung verantwortlich ist.

Die Vorteile des DPE gegenüber der Muttersubstanz zeigen sich in einer verbesserten Permeation in das Auge und der damit verbundenen besseren Wirksamkeit. Diese Vorzüge werden bei der galenischen Formulierung umgesetzt. Während Epinephrin-Präparate in Konzentrationen von 1–2 % eingesetzt werden, beinhalten Dipivefrin-Präparate i. d. R. 0,1 % Wirkstoff. Das entspricht einer Verringerung der notwendigen Konzentration des Wirkstoffs um den Faktor 10–20; um den gleichen Faktor sinken die systemische Aufnahme und die damit verbundenen Nebenwirkungen der über den Tränenkanal abgeflossenen Arzneistoffmenge. Eine weitere Absenkung der Konzentration wäre theoretisch durch eine Erhöhung des üblichen pH-Wertes der Präparationen von 3 auf 5 möglich, wodurch Yamauchi eine Verbesserung der Wirksamkeit von DPE gegenüber Epinephrin um den Faktor 50 erreichen konnte [YAMAUCHI et al. 1988]. Der damit einhergehende Stabilitätsverlust der Zubereitung verhindert allerdings die reale und wirtschaftliche Anwendung.

Der pH-Wert der verwendeten pharmazeutischer Zubereitungen liegt zwischen 2,5 und 3,5. Dieser pH-Wert unterscheidet sich deutlich von physiologischen pH-Wert mit 7,4. Notwendig ist diese Abweichung aufgrund der für die pharmazeutischen Zubereitungen unzureichende Stabilität des Dipivefrin bei pH-Werten > 3,5. Die durch den niedrigen pH-Wert auftretende mögliche Reizung des Auges bei der Applikation wird im Allgemeinen gut vertragen und steht der Anwendung nicht entgegen.

3.2.1.6 Präparate

Das erste Präparat (Propine® (dipivefrin HCl) Sterile Ophthalmic Solution, 0,1 %) wird seit 1980 in den USA zur Drucksenkung bei chronischem Offenwinkelglaukom vermarktet. Eine Reihe von Kombinationspräparaten des Dipivefrins mit Betaxolol, Dexamethason, Guanethidin und Pilocarpin wurden patentiert.

Auf dem deutschen Markt sind Monopräparate der Firmen Pharm-Allergan GmbH (d Epifrin® 0,1 %) und Alcon Pharma GmbH (Glaucothil® 0,1 %) im Handel. Die Firma Alcon hat weiterhin Kombinationspräparate mit Pilocarpinhydrochlorid (Thiloadren® N) und Guanethidinsulfat (Thilodigon®) auf dem Markt.

3.2.2 Cyclodextrine

3.2.2.1 Native Cyclodextrine

Cyclodextrine sind aus sechs bis zwölf verknüpften Glukoseeinheiten aufgebaute Oligosaccharide. Sie wurden 1891 von Villiers als Abbauprodukte der Stärke isoliert. Die Aufklärung der zyklischen Struktur gelang erstmals Schardinger 1904; nach ihm werden sie gelegentlich Schardinger-Dextrine genannt. Die Aufklärung der 1,4- α -glycosidischen Verknüpfung der Glucosemoleküle und das Finden der Möglichkeit zur Klathratbildung erfolgte 1938 durch Freudenberg [FREUDENBERG und MAYER-DELIUS 1938]. Die am häufigsten vorkommenden CD mit sechs, sieben und acht Glukoseeinheiten werden als α -, β - bzw. γ -CD bezeichnet. Ihre Strukturen wurden in der Zeit von 1942–1948 aufgeklärt [FRENCH und RUNDLE 1942, FREUDENBERG und CRAMER 1948].

Die Darstellung der CD beginnt mit einer Hydrolysierung von Stärke, der anschließend unter Zuhilfenahme des bakteriellen Enzyms *Bacillus macerans*-Amylase (Cyclodextrin-Glycosyltransferase, CGTase, EC 2.4.1.19, erste Isolierung von Tilden [TILDEN und HUDSON 1939]) die in Abbildung 3.8 dargestellte Zyklisierung folgt. Diese spezielle Amylase kann eine Windung der aus sechs Glukoseeinheiten bestehenden linksgängigen Schraube der Stärke ablösen und deren Enden ringförmig verknüpfen. Der durch den Ringschluss entstehende Hohlraum, auch Kavität genannt, hat einen von der Anzahl der ihn bildenden Glucosemoleküle abhängigen Durchmesser. Diese Angabe und weitere physikalisch-chemische Daten sind Tabelle 3.3 zu entnehmen.

Die Kavität der CD ist im hohen Maße für die besonderen Eigenschaften verantwortlich. Durch die nach auswärts gerichteten Hydroxylgruppen ist das CD-Molekül an der Außenseite deutlich hydrophiler als die Innenseite der Kavität, die durch die lipophileren Kohlenstoff- und die Ether-Gruppierungen bestimmt wird. Dadurch können lipophile Moleküle, passende molekulare Dimension vorausgesetzt, in der leicht konischen Kavität eingeschlossen werden. Eine Besetzung der Kavität ist aber nicht ausschließlich Molekülen vorbehalten, die gänzlich von der Kavität umschlossen werden können. In vielen Fällen sind, u. a. bei vielen Arzneistoffen, die Moleküle wesentlich größer als die Kavität. Hier findet lediglich ein Einschluss von geeigneten, passgerechten Strukturen des Gastmoleküls

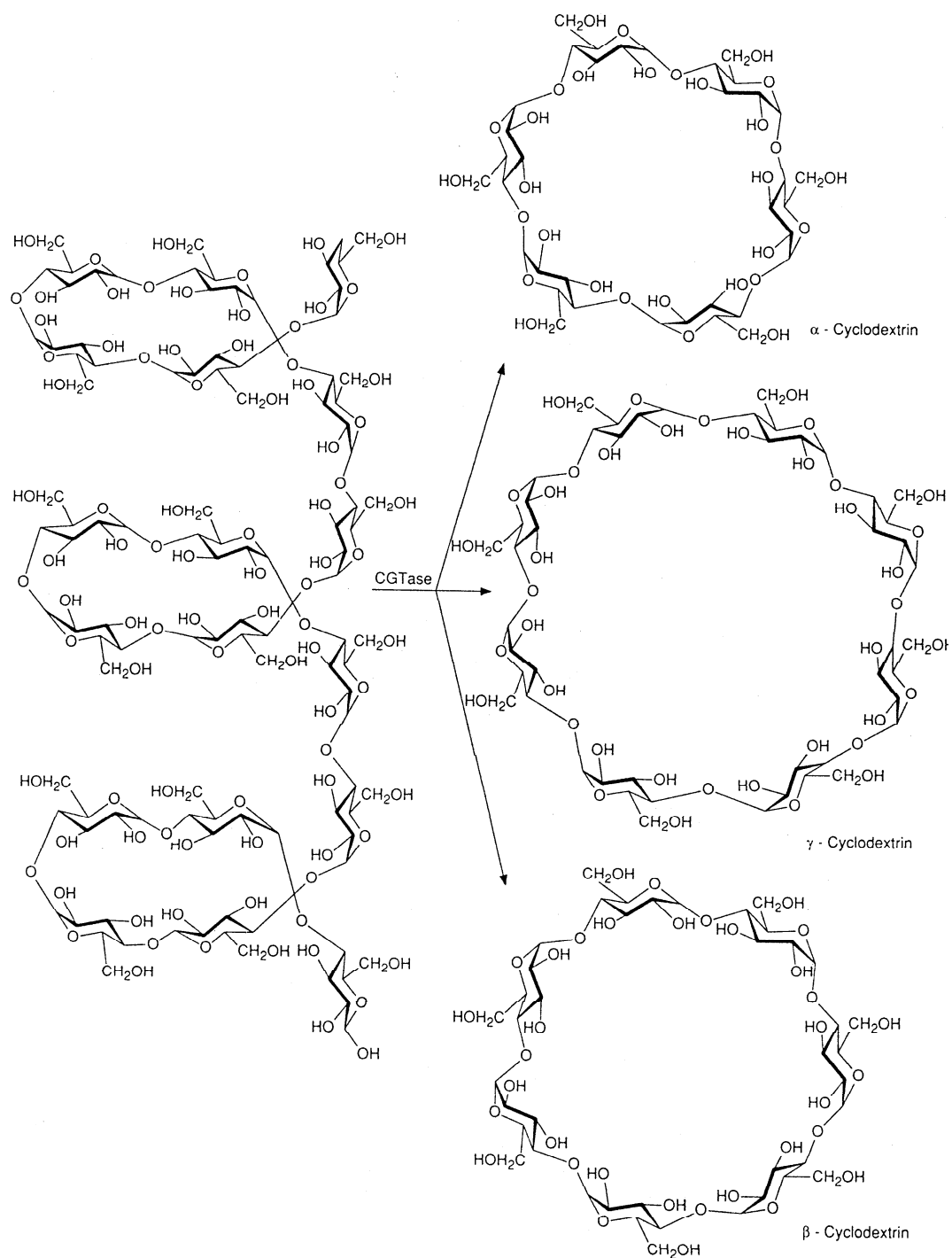


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Synthese von α -, β -, und γ -Cyclodextrin mit Hilfe des Enzyms Cyclodextrin-Glycosyltransferase [[HAGERS HANDBUCH DER PHARMAZEUTISCHEN PRAXIS 1993](#)]

Tabelle 3.3: Eigenschaften der nativen Cyclodextrine [SZEJTLI 1982]

	α -CD	β -CD	γ -CD
Relative Molekülmasse	972	1135	1297
Durchmesser der Kavität [Å]	4,7	8	10
Volumen der Kavität [Å ³]	176	346	510
Anzahl der Wassermoleküle/Kavität	6	11	17
Kristallwassergehalt [%]	10,2	13,2–14,5	8,13–17,7
Wasserlöslichkeit (25°C) [g·l ⁻¹]	145	18,5	232

statt. Stabilisiert wird dieser Einschluss durch eine Verminderung der Ringspannung, durch hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals- und/oder Wasserstoffbrückenbildung [SZEJTLI 1988].

Durch den Einschluss in die Kavität kommt es zu löslichkeitsverbessernden Effekten und damit in vielen Fällen zu einer Verbesserung der Resorption in vivo und zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit von schwerlöslichen Arzneistoffen. CD-induzierte Veränderungen der Membranen können darüber hinaus zur Verbesserung der Permeabilität für Arzneistoffe führen, man spricht in diesem Fall von „Enhancer-Effekten“. Von den Derivaten der CD werden einige gezielt zu diesem Zweck eingesetzt [UEKAMA et al. 1994, PRESS et al. 1995, LOFTSSON und SIGURDARDOTTIR 1994].

In zunehmendem Maße entwickelt sich auch die Textilindustrie zu einem Hauptnutzer der besonderen Eigenschaften der Cyclodextrine. Einige der Einsatzgebiete sind die Färberei der Stoffe, bei der Farbpigmente in Cyclodextrinen, die an die textilen Fasern gebunden sind, eingelagert werden, um damit definierte „wash-out“-Effekte zu erzielen; bzw. faserbindende Cyclodextrine, die bei einem Waschvorgang in der Lage sind, größere Mengen Parfümöl aufzunehmen als die Cyclodextrin-freien Gewebe. Die CD geben die Parfümöle beim Tragen der Textilien verzögert ab und nehmen dabei gleichzeitig die mikrobiellen Stoffwechselprodukte in Folge des Schwitzens auf [BUSCHMAN et al. 1998]. Notwendig sind hierfür CD-Derivat, die mit textilen Fasern reagieren, z. B. Monochlortriazinyl- β -Cyclodextrin; damit lassen sich desweiteren Repellentien, UV-Absorber, Anti-foulingmittel und Bakterizide an Textilien fixieren [GRÖGER et al. 2001].

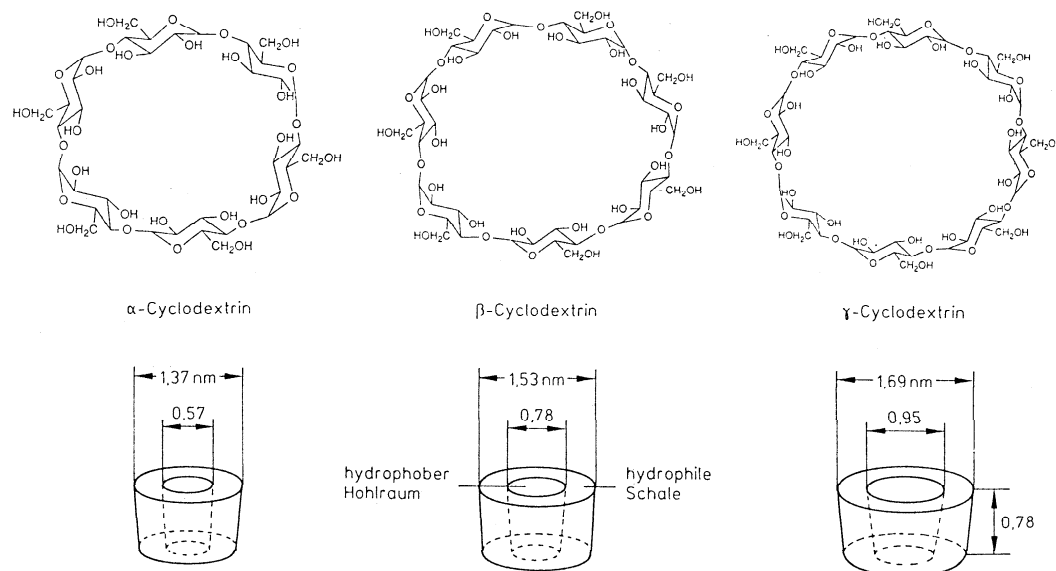


Abbildung 3.9: Chemische Struktur und räumliche Anordnung von α -, β -, und γ -Cyclodextrin [FIEDLER 1996]

3.2.2.2 Substituierte Cyclodextrine

Durch Substitutionen an den OH-Gruppen der verschiedenen Cyclodextrine, u. a. mit Methyl-, Maltosyl-, Hydroxypropyl- und Carboxyethyl-Resten, lässt sich insbesondere deren Wasserlöslichkeit verbessern. Unter den substituierten, hydrophilen Cyclodextrinen haben die hydroxyalkylierten β -Cyclodextrine aufgrund ihrer sehr guten Wasserlöslichkeit und nicht zuletzt wegen ihrer geringen oder nicht messbaren Toxizität besondere Bedeutung erlangt [JANSEN et al. 1990]. Die schlechte Wasserlöslichkeit des β -CD von $18,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ wird durch Hydroxypropylierung auf $500 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ erhöht. Bei den handelsüblichen hydroxyalkylierten CD handelt es sich nicht um Reinsubstanzen, sondern um amorphe Mischungen verschiedengradig substituierter CD, die mit ihrem durchschnittlichen Substitutionsgrad deklariert werden.

Für die Untersuchungen war die Verwendung eines in Wasser gut löslichen β -Cyclodextrin-Derivates notwendig. Hierfür wurde das HP- β -CD ($M_r=1193$) ausgewählt. Um einen eventuellen Einfluss der Derivatisierung zu erfassen, wurden darüber hinaus zu vergleichenden Studien auch die Hydroxypropyl-Derivate von

Tabelle 3.4: Toxikologische Daten der nativen Cyclodextrine [WACKER-CHEMIE 1996]

	α -CD	β -CD	γ -CD
LD ₅₀ (oral, Ratte)	>10 g·kg ⁻¹	>5 g·kg ⁻¹	>8 g·kg ⁻¹

α -CD und γ -CD einbezogen (HP- α -CD: $M_r=1030$, HP- γ -CD: $M_r=1355$).

3.2.2.3 Toxizität der Cyclodextrine

Die Cyclodextrine gelten allgemein als weitgehend toxikologisch unbedenklich [WACKER-CHEMIE 1996]. Für die orale Applikation ist davon auszugehen, dass auf Grund ihrer Molekülgröße und Hydrophilie nur geringe Mengen der CD durch die Darmschleimhaut resorbiert werden [SZEJTLI 1988] und ein nahezu vollständiger Abbau zu Glucose durch die Darmflora erfolgt [WACKER-CHEMIE 1996]. In Tabelle 3.4 sind beispielhaft die LD₅₀-Werte, die an Ratten für die orale Applikation der nativen CD ermittelt wurden, aufgelistet.

Cyclodextrine sind in der Lage, aus biologischen Membranen durch „Komplexierung“ Cholesterol, Phospholipide, Gallate und Proteine herauszulösen [BENTLEY et al. 1997, MIYAJIMA et al. 1986]. Für die corneale Gewebeschädigung wurden hierbei die Art des Cyclodextrins und seine Substituierung als entscheidend gefunden. α -CD führte bereits in Konzentrationen ab 4 % zu sichtbaren Gewebeveränderungen [KANAI et al. 1989]. Demgegenüber waren für HP- β -CD (12,5 %) auch bei wiederholter Applikation keine Schäden an der Cornea messbar. Für DM- β -CD (5 %) fanden Jansen et al. dagegen eine deutliche Schädigung am Kaninchenaugenauge [JANSEN et al. 1990]. In Permeationsuntersuchungen wurde auch für das einfach methylierte β -Cyclodextrin (M- β -CD) ein Einfluss auf die Cornea festgestellt [SIEFERT und KEIPERT 1997]. Die durch Membranveränderungen erhöhte Wirkstoffpermeabilität („Enhancereffekt“) wird mit ausgewählten β -CD-Derivaten gezielt eingesetzt [UEKAMA et al. 1994, LOFTSSON und SIGURDARDOTTIR 1994].

3.2.3 Butyrylcholinesterase

Das Enzym Butyrylcholinesterase [EC 3.1.1.8] (ButChE) findet sich im Blutplasma, der Leber, dem Pankreas, der intestinalen Mukosa, der weißen Substanz im Zentralnervensystem und in geringen Mengen in der Cornea. Mitunter wird ButChE als Serumcholinesterase bezeichnet, im Gegensatz zur Acetylcholinesterase (AChE), die gelegentlich auch als Erythrozytencholinesterase bezeichnet wird. ButChE hydrolysiert Butyrylcholin viermal schneller als AChE; demgegenüber wird D- β -Methyl-Acetylcholin nur von der AChE hydrolysiert.

Die relative Molekülmasse von ButChE beträgt 440 000 Da [LEE und HARPST 1973, MAIN et al. 1974]. Das Enzym besitzt eine tetramere Struktur mit gleichgroßen Untereinheiten von 110 000 Da [LEE und HARPST 1973]. Es ist ein Glycoprotein, dessen Aminosäure- und Kohlenwasserstoffstrukturen von Main nach Vorarbeiten von Chiu und Pavlic aufgeklärt wurden [MAIN et al. 1974, CHIU et al. 1972, PAVLIC 1972]. Das pH-Optimum liegt bei 6,0–8,0 [AUGUSTINSSON 1960]. Der Extinktionskoeffizient beträgt $E_{280}=13,6$ [MAIN et al. 1974]. ButChE ist durch die Ionen Ca^{2+} und Mg^{2+} aktivierbar [AUGUSTINSSON 1960]. Physostigmin ab einer Konzentration von $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, verschiedene phosphororganische Ester, Carbamate und quartäre Ammoniumsalze hemmen die Aktivität des Enzyms [AUGUSTINSSON 1960, KAMARIC 1975, KOELLE et al. 1974, MILLNER et al. 1974, STANLEY et al. 1974, ASHANI et al. 1972, POST 1971]. Tabelle C.2 (S. 183) enthält detaillierte Angaben über die in den Versuchen verwendete ButChE.

Eine Reihe von Methoden zur Bestimmung der Aktivität (Assays) von ButChE wurden entwickelt [GRUBIC et al. 1975, AUGUSTINSSON und ERICKSSON 1974, SMITH 1974, BROWNSON und WATTS 1973a, BROWNSON und WATTS 1973b, DIETZ et al. 1973, ELLIN 1972, BAUM und WARD 1971, GARRY 1971, HANSS und REY 1971]. Die Angabe der Aktivität erfolgt in Einheiten (units): dabei entspricht ein unit der Hydrolyse von $1 \mu\text{Mol}$ Butyrylcholin zu Cholin und Butyrat pro Minute. Die Angabe von pH-Wert und Temperatur ist bei der Bestimmung bzw. bei Versuchen mit ButChE aufgrund der hohen Abhängigkeit von enzymatischen Reaktionen von beiden Parametern zwingend erforderlich.

Kapitel 4

Enzymatische Untersuchungen

4.1 Allgemeine Bemerkungen

Chemische Umsetzungen in einem lebenden Organismus sind nur durch die Mitwirkung von Enzymen möglich. Die Stoffe, die durch sie umgesetzt werden, bezeichnet man als Substrate. Dabei reagieren die Enzyme im Allgemeinen nur mit spezifischen Substraten und katalysieren deren Umwandlung in ein weiteres Substrat oder ausscheidbares Produkt bis zur Einstellung eines Gleichgewichts. Die Substrat- und Wirkungsspezifität der Enzyme beruht auf sterischen und Ladungs-Eigenschaften der Substrate.

4.2 Der diskontinuierliche Rührkesselreaktor

4.2.1 Charakteristische Eigenschaften des isothermen Reaktors

Ein strömungstechnisch idealer diskontinuierlicher Rührkesselreaktor wird chargenweise betrieben. Während einer Reaktion werden die Stoffe weder ab- noch zugeführt. Im Hinblick auf die Reaktionsmasse stellt der ideale diskontinuierliche Rührkesselreaktor ein geschlossenes System dar. „Infolge einer intensiven

Rührung der Reaktionsmasse werden vollständiger Konzentrationsausgleich und Temperaturkonstanz in der gesamten Reaktionsmasse zu jedem betrachteten Zeitpunkt erzielt. Damit ist die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von den Reaktorkoordinaten. Während die Reaktionsmasse zu jedem Zeitpunkt an jedem Ort die gleiche Zusammensetzung hat, ändert sich die Zusammensetzung der Reaktionsmasse mit fortschreitender Reaktionszeit.“ [KNORRE 1981] Demzufolge ist die Änderung der Stoffmengen der Komponenten im Reaktionsraum ausschließlich auf die Reaktion zurückzuführen.

Auf Grund technischer Gegebenheiten ist ein vollständig ideales Verhalten selten zu erreichen. Es ist aber bei Eingriffen in das System zu berücksichtigen, dass die bestehenden Verhältnisse im System gewahrt bleiben.

4.2.2 Bilanzgleichungen des idealen Reaktors

Mit Hilfe von Bilanzgleichungen lassen sich die Zusammenhänge zwischen dem Reaktionsablauf als Funktion der Prozessparameter herstellen. Bei isothermer Betriebsweise und unter der Annahme, dass die Enthalpieänderungen bei den Reaktionen für die Gesamtenergiebilanz des Systems keine Rolle spielen, reduziert sich die Lösung auf Stoffbilanzgleichungen.

Für einen isothermen Reaktor ($\frac{dT}{dt} = 0$) gilt daher:

$$\left(\frac{dc_j}{dx_i}\right)_t = 0 \quad (4.1)$$

$$\left(\frac{dT}{dx_i}\right)_t = 0 \quad (4.2)$$

c ... Konzentration

j ... Komponente ($j = 1 \dots n$)

x ... Koordinate

i ... Richtung ($i = 1 \dots n$)

t ... Reaktionszeit

T ... Temperatur

Es bestehen während des gesamten Reaktionsverlaufs ein vollständiger Konzentrationsausgleich und eine Temperaturkonstanz; die Reaktionsgeschwindigkeit ist von den Raumkoordinaten unabhängig, die Zusammensetzung für jeden beliebigen Zeitpunkt t ($t_0 \leq t \leq t_{Ende}$) an jedem Ort gleich. Währenddessen ändert sich die Zusammensetzung der gesamten Reaktionsmasse mit fortschreitender Zeit. Die Änderung der Molzahl der Reaktionskomponenten ist ausschließlich auf die Reaktion zurückzuführen:

$$\left(\frac{dn_j}{dt}\right) = \left(\frac{dn_j}{dt}\right)_{Reaktion} \quad (4.3)$$

n ... Molzahl

j ... Komponente ($j = 1 \dots n$)

Bei Flüssigphasenreaktionen spielen Volumen- bzw. Dichteänderungen nur bei unverdünnten Lösungen eine Rolle und können im vorliegenden Fall bei der Arbeit mit verdünnten wässrigen Lösungen vernachlässigt werden. Bei Volumenkonstanz gilt somit das Differenzial-Gleichungssystem:

$$\frac{dc_j}{dt} = \sum v_j r_j \quad (4.4)$$

$$dc_j = \frac{dn_j}{V_R} \quad (4.5)$$

v ... Molvolumen

r ... Reaktionsgeschwindigkeit

V_R ... Reaktorvolumen

4.3 Probenvorbereitung

Wie aus vielfältigen Untersuchungen bereits bekannt, bestehen bei den Corneae-pithelien von Rinderaugen große intra- und interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Trockenmasse, des Eiweißgehaltes und der enzymatischen Leistung

des Epithels. Die Stoffwechselleistungen werden in der Literatur mit Schwankungsbreiten von 20–67 % angegeben [DOUGHTY 1996]. Die untere Grenze wird nur durch eine konsequente Umsetzung konstanter Transportbedingungen und die bei Doughty beschriebene sorgfältige Auslese des Probenmaterials erreicht.

Um die eigenen Versuche durchzuführen, wurden Rinderaugen vom nächstgelegenen Schlachthof bezogen. Die Augen wurden unmittelbar nach der Schlachtung in das Transportbehältnis überführt. Eine Vorsortierung oder Unterscheidung nach einzelnen Rinderrassen durch das Personal des Schlachthauses fand nicht statt. Als Transportmedium diente der glucosehaltiger Vollelektrolytpuffer (s. Anh. C, Tab. C.4), der auch die Grundlage für alle weiteren Versuche darstellte.

Ein Teil des Puffers wurde eingefroren und für den Transport als „Eis/Wasser-Mischung“ verwendet. Dadurch konnte eine konstante Temperatur von 0 °C während des maximal einstündigen Transportes sichergestellt werden. Alle Augen mit sichtbaren mechanischen Schäden an Cornea, Linse oder Iris-Ziliar-Körper wurden ausgesondert. Die verbliebenen Augen wurden ausgiebig mit Pufferlösung pH 7,4 gespült, um alle Reste anhaftenden Blutes, dessen Gehalt an Esterasen um Zehnerpotenzen höher liegt im Corneaepithel, zu entfernen. Das Epithel wurde mit Hilfe eines Skalpells vollständig abgehoben, ohne dabei Gewebe der angrenzenden Sklera mit zu erfassen. Das Gewebe von jeweils zehn Corneae wurde in 10 ml Puffer (0 °C) überführt.

Das Poolen von jeweils 10 Corneae zu einer Probe wurde eingeführt, um die oben erwähnten Unterschiede in der Enzymaktivität des Epithelgewebes auszugleichen und grobe Ausreißer zu eliminieren. Der damit einhergehende Verlust der Einzelinformation über die tatsächliche Spannweite der enzymatischen Aktivität in der Rindercornea wurde zugunsten der notwendigen Verallgemeinerung der Ergebnisse in Kauf genommen.

Das im Puffer befindliche Epithel wurde zuerst unter ständiger Eiskühlung mit einem Ultra-Turrax 60 s lang zerkleinert. Anschließend wurde die Probe, ebenfalls unter Eiskühlung, mit einem Potter S innerhalb von 60 s homogenisiert. Die erhaltenen Proben gelangten für die enzymatischen Versuche sofort zur Verwendung oder wurden tiefgefroren für spätere Untersuchungen aufbewahrt. Für die Untersuchungen wurde auf eine Separierung der Mikrosomenfraktion verzichtet

und mit dem Gesamthomogenat des cornealen Epithels gearbeitet. Eine Charakterisierung oder Isolierung einzelner Enzyme war für die Zielsetzung nicht notwendig.

Die Tiefkühlagerung erfolgte bei -84°C . Durch vergleichende Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität der gefrorenen Proben in einem Zeitraum von bis zu 12 Monaten annähernd erhalten bleibt. Proben bis zu einem Lagerungszeitraum von 6 Monaten zeigten keinen statistisch gesicherten Unterschied in der enzymatischen Leistung gegenüber frisch hergestelltem Untersuchungsmaterial (s. Anh. A.3).

Auf die Anwendung eines speziellen Viabilitätstestes wurde verzichtet. Dem liegt die Überlegung zugrunde, dass, wie später noch weiter ausgeführt, eine reproduzierbare enzymatische Leistung beim Abbau von Dipivefrin gefunden wurde. Des Weiteren erwies sich die in den verschiedenen Chargen gefundene Abbauleistung im Rahmen der für biologische Systeme üblichen Schwankungen als konstant. Diese Ergebnisse sprechen darüber hinaus für eine einheitliche Proben Gewinnung und Aufarbeitung sowie für konstante Bedingungen bei der Versuchsdurchführung und Analytik.

4.4 Versuchsdurchführung

Ausgangspunkt für die Versuche war die Bestimmung der spontanen Hydrolyse von Dipivefrin (s. 3.2.1.4) im verwendeten Puffer bei pH 7,4 im Sinne einer Stabilitätsuntersuchung von Dipivefrin. Über einen Zeitraum von 5 h wurden im Abstand von jeweils 60 min Proben entnommen und mittels HPLC der Gehalt an Dipivefrin und Epinephrin bestimmt. Das System entspricht dem o. a. isothermen diskontinuierlichen Rührkesselreaktor. Alle Inkubationen wurden bei $33 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Probengefäße mit einem horizontalen Exzenter bei einer Drehzahl von 100 min^{-1} bewegt, um eine einheitliche Durchmischung zu gewährleisten. Aufgrund seiner sehr guten Löslichkeit in Wasser wurde für alle Versuche das auch in der pharmazeutischen Praxis eingesetzte Dipivefrin-Hydrochlorid verwendet.

Die Ausgangskonzentration betrug 0,1 % Dipivefrin-Hydrochlorid. Wie in der

Literatur bereits beschrieben, bewirkt DPE eine konzentrationsabhängige Hemmung der enzymatischen Esterspaltung im Auge (s. 3.1.3.5). Eine Selbsthemmung der Hydrolyse mit steigender Konzentration an DPE ist die Folge. Damit diese Selbsthemmung nicht zusätzlich Einfluss auf die Versuchsergebnisse nimmt, wurde die Ausgangskonzentration an DPE in den Versuchsreihen nicht variiert.

Um den Gegebenheiten am Auge eher gerecht zu werden, wurde für die Untersuchungen mit den Cyclodextrinen die Inkubationsdauer auf 90 min reduziert. Die Probennahme erfolgte hierbei alle 10 min. Die entnommenen Anteile wurden verdünnt, filtriert und sofort mittels HPLC vermessen.

Der Einfluss der Cyclodextrine auf die Esterhydrolyse von DPE wurde in abgestuften Konzentrationsreihen der Cyclodextrine getestet. Die nativen Cyclodextrine, α -, β - und γ -Cyclodextrin, und die substituierten Cyclodextrine, HP- α -, HP- β - und HP- γ -Cyclodextrin, wurden in den molaren Verhältnissen (CD:DPE) von 1:1, 4:1, 8:1 und 16:1 untersucht. Bei β -CD musste wegen seiner geringen Löslichkeit in dem verwendeten Puffersystem auf die Konzentration im Verhältnis 16:1 verzichtet werden.

Für die Untersuchungen mit dem Reinenzym ButChE wurde festgelegt, dass die einzusetzende Enzymmenge so zu wählen war, dass damit in dem bekannten Puffersystem ohne CD-Zusatz unter gleichen Bedingungen nach 90 min derselbe Umsatz von DPE erzielt wird wie in den Versuchen mit dem Cornea-Epithelhomogenat.

4.5 Auswertung

4.5.1 Vorversuche

Mit Versuchen über eine Untersuchungsdauer von 5 h wurde die spontane Hydrolyserate von Dipivefrin im verwendeten Puffersystem pH 7,4 bestimmt. Während der Versuche erfolgte eine Gehaltsbestimmung von Dipivefrin und Epinephrin in Intervallen von 60 min mittels HPLC. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Bei der Addition der Stoffmengenkonzentrationen von Dipivefrin und

Epinephrin wäre eine Stoffmengengesamtkonzentration von $2,58 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ für den Fall zu erwarten, dass sich bei der Hydrolyse kein Monopivalylepinephrin anreichert und kein oxidativer Abbau von Epinephrin stattfindet.

Tabelle 4.1: Hydrolytische Spaltung von Dipivefrin zu Epinephrin in Pufferlösung innerhalb von 5 h

Zeit [h]	DPE [mmol·l ⁻¹]	EPI [mmol·l ⁻¹]	DPE+EPI [mmol·l ⁻¹]	Fehlmenge [%]
0	2,58	0,00	2,58	0,00
1	2,46	0,11	2,57	0,39
2	2,37	0,20	2,57	0,39
3	2,26	0,30	2,56	0,77
4	2,11	0,45	2,56	0,77
5	2,03	0,52	2,55	1,16

In gleicher Weise wurde eine Messreihe erstellt, die die hydrolytischen Vorgänge im Cornea-Epithelhomogenat widerspiegelt. Die Konzentrationsmessungen von DPE und EPI fanden in denselben Zeitabständen und mit derselben Messmethode statt (Tabelle 4.2). Die Abbildungen 4.1 und 4.2 zeigen die zugehörigen Kurvenverläufe. Die hydrolytische Spaltung von Dipivefrin in Pufferlösung verläuft über 5 h linear. Demgegenüber endet der lineare Kurvenverlauf der Spaltung von Dipivefrin in Epithelhomogenat nach 4 h; zu diesem Zeitpunkt sind $\approx 95 \%$ des Dipivefrins hydrolysiert. Nach einer Inkubation von 5 h war im Homogenat kein Dipivefrin mehr nachweisbar.

Während der Versuche konnte eine rötliche Verfärbung der Versuchsansätze beobachtet werden, die in der Pufferlösung nach 4 h und im Homogenat nach 2 h sichtbar wurde, was auf eine verstärkte Abbaureaktion im Homogenat hinweist. Die Auswertung der Stoffmengenbilanzen von DPE und EPI führt zu maximalen Fehlbeträgen von 1,16 % für den Versuch in Puffer bzw. 3,10 % für den Versuch im Homogenat. Mehrere Ursachen können hierfür eine Rolle spielen. Möglicherweise fehlen in der Stoffmengenbilanz das 3- bzw. 4-Monopivalylepinephrin, dem steht aber entgegen, dass mittels HPLC-Analyse keine Signale erfasst wurden, die diesen Zwischenprodukten der Hydrolyse zugeordnet werden konnten.

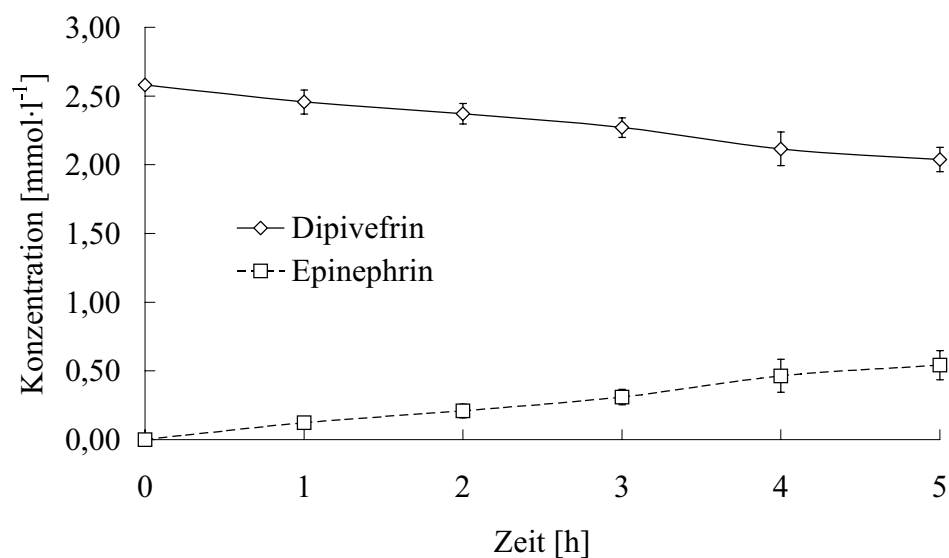


Abbildung 4.1: Hydrolytische Spaltung von Dipivefrin zu Epinephrin in Pufferlösung innerhalb von 5 h; $\bar{x} \pm s$, $n=6$

Tabelle 4.2: Hydrolytische Spaltung von Dipivefrin zu Epinephrin in Cornea-Epithelhomogenat innerhalb von 5 h

Zeit [h]	DPE [mmol·l ⁻¹]	EPI [mmol·l ⁻¹]	DPE+EPI [mmol·l ⁻¹]	Fehlmenge [%]
0	2,58	0,00	2,58	0,00
1	1,97	0,60	2,57	0,39
2	1,47	1,09	2,57	0,39
3	0,72	1,86	2,56	0,77
4	0,14	2,38	2,52	2,32
5	0,00	2,50	2,50	3,10

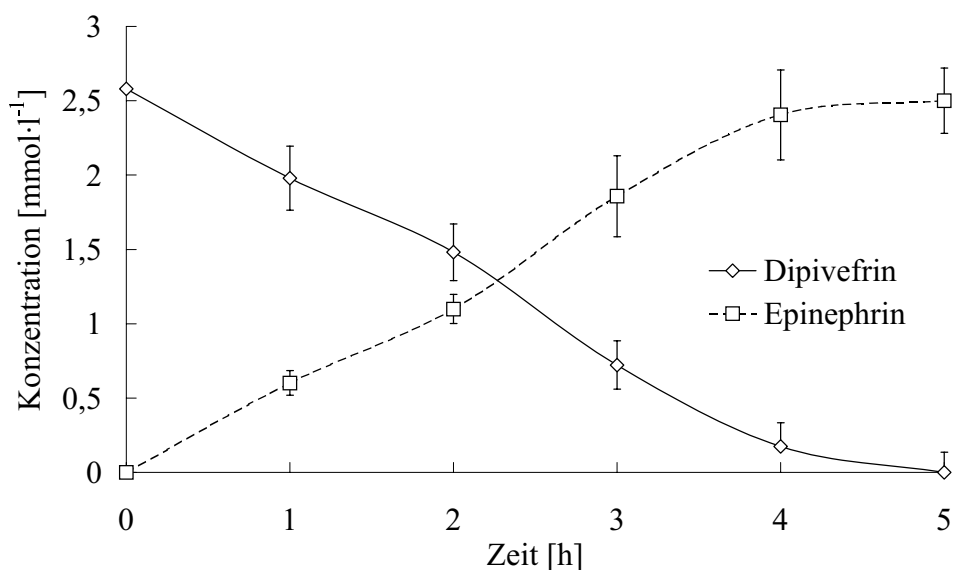


Abbildung 4.2: Hydrolytische Spaltung von Dipivefrin zu Epinephrin in Cornea-Epithelhomogenat innerhalb von 5 h; $\bar{x} \pm s$, $n=6$

Wichtig sind in diesem Zusammenhang die beobachteten rötlichen Verfärbungen. Wie schon in Kapitel 3.2.1.4 angesprochen, führt der oxidative Abbau von Epinephrin zu intensiv gefärbten Produkten. Es ist davon auszugehen, dass die Fehlmengen in den Stoffmengenbilanzen das Ergebnis des oxidativen Abbaus von EPI sind.

Auf den analytischen Nachweis der Abbauprodukte von EPI wurde verzichtet, da eine weitere Untersuchung des oxidativen Abbaus von Epinephrin nicht Anliegen der Arbeit sein sollte. Die vorgesehene Inkubationszeit von 1,5 h liegt im zeitlichen Rahmen noch vor dem Auftreten dieser Verfärbungen.

Mit dem geführten Nachweis der konstanten Summe der Stoffmengen von DPE und EPI konnte in den weiteren Versuchen auf die Betrachtung des EPI verzichtet werden. Alle weiteren Werte und Berechnungen wurden daher auf den pharmazeutischen Wirkstoff Dipivefrin beschränkt.

Abbildung 4.3 zeigt den Kurvenverlauf für den Dipivefrin-Abbau über 90 min im Homogenat, ohne den Einfluss von zugesetzten Cyclodextrinen. Zur Verdeutlichung des Anteils der spontanen Esterhydrolyse ist zusätzlich der Kurvenverlauf der Hydrolyse im Puffer dargestellt, die am Versuchsende $\approx 7\%$ beträgt. Die

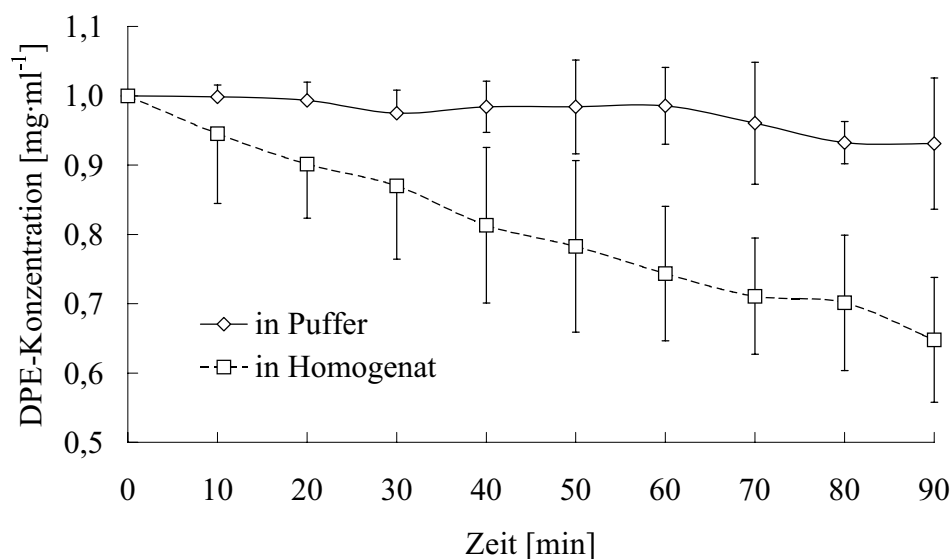


Abbildung 4.3: Dipivefrin-Abbau im Epithelhomogenat und im Puffer innerhalb von 90 min; $\bar{x} \pm s$, $n=8$

durch das Homogenat erreichte Hydrolyserate liegt dagegen bei $\approx 35\%$. Sie dient im Folgenden als Bezugsgröße für die Bewertung des Einflusses der Cyclodextrine auf eine Hemmung bzw. Beschleunigung des Dipivefrin-Abbaus.

Um die zahlenmäßigen Werte des Dipivefrin-Abbaus durch das Reinenzym ButChE mit den im Homogenat ermittelten Werten vergleichen zu können, wurde für die ButChE-Versuche vorher der Bezugspunkt auf 35 % Umsatz festgelegt. Die Versuchsbedingungen wurden so gestaltet, dass für alle Versuche die Enzymmenge zum Einsatz kam, die ausreichte, um vom eingesetzten DPE innerhalb von 90 min, ohne Zusatz von Cyclodextrinen, 35 % hydrolytisch abzubauen.

4.5.2 Dipivefrin-Abbau im Cornea-Homogenat

In Abbildung 4.4 ist der prozentuale Umsatz von Dipivefrin aus 4.5.1 über 90 min ohne den Zusatz von Cyclodextrinen dargestellt. Der Abbau erfolgt linear (s. a. Abb. 4.1 u. 4.2), d. h. in gleichen Zeiteinheiten werden gleiche Mengen Dipivefrin abgebaut.

Wie schon unter 4.4 angegeben, wurden die Cyclodextrine in abgestuften Kon-

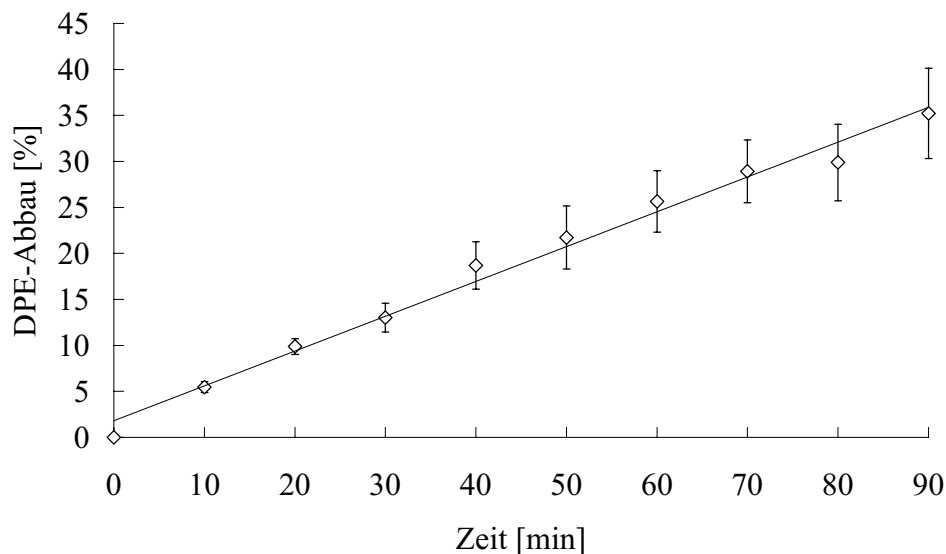


Abbildung 4.4: Prozentualer Dipivefrin-Abbaus im Cornea-Homogenat als Funktion der Inkubationszeit; lineare Regressionsgerade mit $r^2=0,9878$; $\bar{x} \pm s$, $n=8$

zentrationen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Esterhydrolyse von DPE untersucht. Ebenso wie aus den Homogenat-Versuchen mit DPE resultierten auch unter Zusatz von α -, HP- α -, β -, HP- β -, γ - bzw. HP- γ -Cyclodextrin in allen gewählten molaren Verhältnissen von CD:DPE (1:1, 1:4, 1:8 und 1:16) ein linearer Verlauf der $c - t$ -Kurven.

Reaktionskinetisch gesehen folgen die erhaltenen Ergebnisse einem Reaktionsgeschwindigkeitsgesetz 0. Ordnung, da unabhängig von der DPE-Konzentration der Abbau linear, entsprechend der Gleichung 4.6, erfolgt:

$$v_{DPE} = -\frac{dc_{DPE}}{dt} = k \quad (4.6)$$

v_{DPE} ... Reaktionsgeschwindigkeit

k ... Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

Reaktionen 0. Ordnung werden häufig bei komplexen Reaktionen und Vorgängen beobachtet [SCHWETLICK ET.AL. 1982], die ähnlich dem Alkoholabbau

durch das Enzym Alkoholdehydrogenase verlaufen. Für die Untersuchungen bietet es sich daher an, nur die Messwerte nach der Inkubation über $t=90$ min zu betrachten. Im Anhang D sind die Abbauraten des DPE nach 90 min in Abhängigkeit von dem molaren Verhältnis CD:DPE für α -CD/HP- α -CD (Abb. D.1), β -CD/HP- β -CD (Abb. D.2) und γ -CD/HP- γ -CD (Abb. D.3) dargestellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Abbau von Dipivefrin im Epithelhomogenat unter Einwirkung der Cyclodextrine in unterschiedlichen molaren Verhältnissen nach 90 min; $\bar{x} \pm s$, $n=5-9$, $*p<0,05$ (zum 35 %-Wert)

Molverhältnis CD:DPE	Dipivefrin-Abbau [%]					
	α -CD	HP- α -CD	β -CD	HP- β -CD	γ -CD	HP- γ -CD
1:1	29 \pm 9,9	35 \pm 9,9	46 \pm 4,0*	42 \pm 6,8	47 \pm 7,1*	47 \pm 1,7*
4:1	37 \pm 8,2	38 \pm 16,9	26 \pm 3,4*	23 \pm 9,1*	40 \pm 15,2	41 \pm 3,4*
8:1	30 \pm 8,9	27 \pm 10,6	12 \pm 8,5*	16 \pm 2,1*	36 \pm 7,5	38 \pm 8,1
16:1	41 \pm 7,8	30 \pm 14,5		10 \pm 8,8*	31 \pm 10,7	31 \pm 2,3

In Auswertung von Tabelle 4.3 kann allgemein abgeleitet werden, dass sowohl die nativen Cyclodextrine, als auch die substituierten Cyclodextrine den Dipivefrin-Abbau im cornealen Epithel-Homogenat unterschiedlich beeinflussen. Zum einen werden die Abbauraten des DPE, legt man den in Abbildung 4.4 erhaltenen Wert bei einer Inkubationszeit von 90 min (DPE-Abbau: 35 \pm 4,9 %) zugrunde, erhöht und zum anderen teilweise massiv gehemmt.

Bei α -CD und HP- α -CD scheinen die Abbauraten weitgehend unabhängig vom eingesetzten Molverhältnis (CD:DPE) zu sein, d. h. die Ergebnisse bewegen sich zwischen leichter Steigerung bzw. Hemmung der Hydrolyse (s. a. Kapitel 4.5.4), ohne signifikante Unterschiede zu ergeben.

Bei β -CD und HP- β -CD zeigt die Abbaurate eine deutlich Abhängigkeit vom CD:DPE-Verhältnis. Bei einem Molverhältnis von 1:1 ist die DPE-Hydrolyse gegenüber dem CD-freien Ansatz mit 35 % Zersetzung auf 46 % bzw. 42 % gesteigert. Mit zunehmender CD-Konzentration verringert sich der Umsatz von DPE drastisch. Unter Zusatz von HP- β -CD im molaren Verhältnis 16:1 beträgt der Umsatz lediglich noch 10 %.

Durch Zugabe von γ -CD und HP- γ -CD wurde in geringer Konzentration (1:1) die größte Steigerung der Hydrolyserate auf 47 % erzielt. Mit zunehmender CD-Konzentration sinkt die Abbaurate schließlich auf 31 % und ergibt somit im Vergleich zum Umsatz ohne Cyclodextrine von 35 % lediglich eine leichte, aber nicht signifikante Hemmung des Abbaus.

Die Versuche erbrachten weder einen signifikanten noch einen tendenziellen Unterschied der Einflussnahme auf die hydrolytische Esterspaltung des Dipivefrin durch die Hydroxypropylierung der Cyclodextrine.

4.5.3 Dipivefrin-Abbau durch das Reinenzym Butyrylcholinesterase

Wie bereits vorgestellt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiterhin der Einfluss der Cyclodextrine auf den Dipivefrin-Abbau durch ein isoliertes Reinenzym untersucht. Auch bei diesen Versuchen zeigte sich ein Kurvenverlauf über 90 min, analog zu den Versuchen im Homogenat (s. Kap. 4.5.2), d. h. ein linearer Verlauf der $c - t$ -Kurven des Dipivefrin-Abbaus. Für die Betrachtungen der Ergebnisse werden wiederum die Messwerte nach der Inkubation über $t=90$ min herangezogen.

Zur Einhaltung der Versuchsbedingung: 35 % hydrolytischen Umsatz (s. Kap. 4.5.1), war der Einsatz von 22,66 units ButChE notwendig. Damit wurde ein Umsatz von $35 \pm 1,1$ % erzielt.

Im Anhang D sind die Abbauraten des DPE nach 90 min in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis CD:DPE für α -CD/HP- α -CD (Abb. D.4), β -CD/HP- β -CD (Abb. D.5) bzw. γ -CD/HP- γ -CD (Abb. D.6) dargestellt. Die Daten werden in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Die Beeinflussung des DPE-Abbauverhaltens unter ButChE durch die obigen Test-Cyclodextrine zeigt, dass wiederum ein differenziertes Abbauverhalten in Abhängigkeit vom eingesetzten Cyclodextrin sowie dessen Molverhältnis CD:DPE resultiert.

Die Abbauraten von α - und HP- α -CD sind gegenüber dem Vergleichswert von 35 % leicht erhöht. Diese Steigerung ist bei allen gewählten molaren Verhältnissen

Tabelle 4.4: Abbau von Dipivefrin durch ButChE unter Einwirkung der Cyclodextrine in unterschiedlichen molaren Verhältnissen nach 90 min; $\bar{x} \pm s$, n=6, *p<0,05 (zum 35 %-Wert)

Molverhältnis CD:DPE	Dipivefrin-Abbau [%]					
	α -CD	HP- α -CD	β -CD	HP- β -CD	γ -CD	HP- γ -CD
1:1	38 \pm 1,7	36 \pm 0,8	36 \pm 1,9	35 \pm 1,3	37 \pm 0,8	37 \pm 1,6
4:1	36 \pm 0,9	37 \pm 1,1	34 \pm 0,8	33 \pm 0,9	35 \pm 0,8	35 \pm 0,6
8:1	38 \pm 0,8	36 \pm 1,5	32 \pm 1,8*	31 \pm 1,3*	33 \pm 1,7	33 \pm 0,7
16:1	38 \pm 1,3	37 \pm 1,6		24 \pm 0,5*	30 \pm 1,0*	32 \pm 0,7*

CD:DPE etwa gleich. Damit ist der Einfluss von α -CD und seinem Hydroxypropyl-Derivat als unabhängig von der Cyclodextrin-Konzentration anzusehen.

Für β -CD und sein Derivat ist im Gegensatz zu den Homogenat-Versuchen bei einem molaren Verhältnis von 1:1 keine signifikante Steigerung der Hydrolyseleistung feststellbar. Mit Zunahme der CD-Konzentration (molares Verhältnis CD:DPE von 16:1) fällt die Hydrolyserate für DPE unter Einfluss von HP- β -CD signifikant auf 24 %.

Durch die Zugabe von γ -CD und HP- γ -CD in geringer Konzentration (1:1) wurde eine leichte Erhöhung der Hydrolyserate auf 37 % gemessen. Bei einem molaren Verhältnis von 4:1 sinkt die Abbaurate auf den 35 %-Vergleichswert. Eine weitere Steigerung der CD-Konzentration auf 8:1 reduziert den DPE-Umsatz in ungefähr dem Maß, wie durch den Einsatz der β -Cyclodextrine. Im Gegensatz zu HP- β -CD führt bei γ -CD und HP- γ -CD die Erhöhung des Molverhältnisses CD:DPE auf 16:1 lediglich zu einer geringen Absenkung des DPE-Umsatzes.

Analog zu den Versuchen im Homogenat konnte bei der Umsetzung des DPE durch das Enzym ButChE kein signifikanter Unterschied der Einflussnahme zwischen den jeweiligen nativen und hydroxypropylierten Cyclodextrinen nachgewiesen werden.

4.5.4 Vergleich des Dipivefrin-Abbaus im Homogenat und durch das Reinenzym

Wie bereits unter 4.5.2 und 4.5.3 herausgearbeitet, zeigen sowohl die Cornea-Epithelhomogenat- als auch die Reinenzym-Untersuchungen ein differenziertes Dipivefrin-Abbauverhalten gegenüber verschiedenen Cyclodextrinen und Cyclodextrin-Konzentrationen. In den Abbildungen D.7, D.8, D.9, D.10, D.11 und D.12 im Anhang D ab Seite 189 sind für die unterschiedlichen Cyclodextrine das DPE-Abbauverhalten im Homogenat und unter Reinenzymbedingungen mit ButChE gegenüber gestellt.

Die Abbildungen D.7 und D.8 zeigen, wie bereits unter Punkt 4.5.2 erwähnt, einen wechselhaften Einfluss verschiedener α -CD bzw. HP- α -CD Konzentrationen auf den Dipivefrin-Abbau im Cornea-Homogenat. Anders bei den Reinenzymuntersuchungen: Hier wird die Abbaurate fast nicht durch die CD beeinflusst. Nach 90 min Reaktionszeit wird bei den eingesetzten α -CD- und HP- α -CD-Konzentrationen in etwa der gleiche Dipivefrin-Abbau erzielt.

Im Gegensatz dazu ist in den Abbildungen D.9, D.10, D.11 und D.12 deutlich erkennbar, dass mit steigender Cyclodextrin-Konzentration ein geringer Hemmeffekt bei den Reinenzymuntersuchungen zu verzeichnen ist. Auffallend ist, dass die Senkung der Dipivefrin-Abbaurate sowohl bei den Cyclodextrinen der β -Gruppe (β -CD, HP- β -CD) als auch bei denen der γ -Gruppe (γ -CD, HP- γ -CD) nahezu identisch ist.

Andere Verhältnisse liegen bei der Cornea-Homogenat-Untersuchung vor. So fallen z. B. die Dipivefrin-Abbau-Kurven des γ - und des HP- γ -CD um etwa 16 %, d. h. es ergibt sich eine geringfügige Hemmwirkung auf die Abbaurate. Wesentlich deutlicher sind die Effekte jedoch bei β - und HP- β -CD. Bei beiden Cyclodextrinen war mit steigendem Molverhältnis CD:DPE ein signifikant inhibierender Effekt von 32–34 % zu beobachten.

Zur besseren Verdeutlichung der Cyclodextrin-Einflüsse auf den Dipivefrin-Abbau wurden die Messergebnisse aus den Tabellen 4.3 und 4.4 normiert. Diese vorgenommene Normierung erfolgte jeweils mittels des 90-Minuten-Messwertes des Dipivefrin-Abbaus im Cornea-Epithelhomogenat ohne Cyclodextrinzusatz.

Diese Abbaurate betrug $35 \pm 4,9\%$ (s. Abb. 4.4) und wurde zu 100 % festgesetzt. In den Tabellen 4.5 und 4.6 sind die auf diesen Umsatz von 100 % normierten Messwerte für die Homogenat-Versuche und die ButChE-Versuche dargestellt.

Tabelle 4.5: Normierte Dipivefrin-Abbauraten nach 90 min im Cornea-Epithelhomogenat als Funktion der unterschiedlichen Molverhältnisse CD:DPE

Molverhältnis CD:DPE	normierte Dipivefrin-Abbauraten [%]					
	α -CD	HP- α -CD	β -CD	HP- β -CD	γ -CD	HP- γ -CD
1:1	83	100	131	120	134	134
4:1	106	109	74	66	114	117
8:1	86	77	34	46	103	109
16:1	117	86		29	89	89

Im Gegensatz zu den bisherigen Auswertungen zeigen die normierten Ergebnisse ein wesentlich differenzierteres Bild des Cyclodextrineinflusses auf den Dipivefrin-Abbau im Cornea-Epithelhomogenat (s. S. 192 ff.). α -CD und sein Hydroxypropyl-Derivat (Abb. D.13, D.14), β -CD und sein Hydroxypropyl-Derivat (Abb. D.15, D.16) sowie γ -CD und sein Hydroxypropyl-Derivat (Abb. D.17, D.18) üben einen differenzierten Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit des DPE aus. Dies soll am Beispiel β - und HP- β -CD gezeigt werden. In den Abbildungen D.15 und D.16 ist dargestellt, dass es bei einem molaren Verhältnis von 1:1 im Homogenat zu einer Steigerung des DPE-Umsatzes kommt, die bei der ButChE nicht zu beobachten ist. Jedoch kommt es mit steigender CD-Konzentration ab

Tabelle 4.6: Normierten Dipivefrin-Abbauraten nach 90 min durch das Reinenzym ButChE als Funktion der unterschiedlichen Molverhältnisse CD:DPE

Molverhältnis CD:DPE	normierte Dipivefrin-Abbauraten [%]					
	α -CD	HP- α -CD	β -CD	HP- β -CD	γ -CD	HP- γ -CD
1:1	108	102	103	100	105	106
4:1	103	105	97	95	100	100
8:1	109	103	90	89	95	94
16:1	109	106		68	87	91

dem Verhältnis CD:DPE von 4:1 zu einer Wirkungsumkehrung. Bei der höchsten Konzentration (16:1) zeigen sich ausgesprochen starke Hemmeffekte auf den DPE-Umsatz im Homogenat, in Vergleich dazu ist der Hemmeffekt bei der ButChE etwas schwächer.

Im Gegensatz dazu zeigen γ - und HP- γ -CD (Abb. D.17 und D.18) im Homogenat bis zum molaren Verhältnis 8:1, mit der ButChE bis 4:1, eine Steigerung des Abbaus von DPE. Erst bei einem großen Überschuss an CD (Molverhältnis 16:1) kommt es zu einer Hemmung des Umsatzes von DPE im Homogenat und durch ButChE.

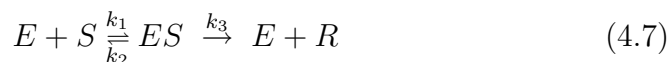
Wie schon mehrfach erwähnt, liefern α - und HP- α -CD (Abb. D.13 und D.14) ein sehr wechselhaftes Bild von ihrem Einfluss auf die Hydrolyse von DPE. Während beide Cyclodextrine im Homogenat einen uneinheitlichen Einfluss ausüben, der sich nicht mit der CD-Konzentration korrelieren lässt, ist der Abbau des DPE durch die ButChE durchgängig schwach erhöht.

4.6 Diskussion

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Hemm- bzw. Steigerungseffekte des Dipivefrin-Abbaus liegt offensichtlich im molekularen Bereich der einzelnen Cyclodextrine begründet. Geht man von der allgemeinen Formulierung enzymatischer Reaktionen aus:



so kann unter Berücksichtigung der Tatsache, dass alle enzymatischen Reaktionen Gleichgewichtsreaktionen sind, folgende Reaktionsgleichung (Gl. 4.7) formuliert werden:



E ... Enzym

S ... Substrat

ES ... Enzym-Substrat-Komplex

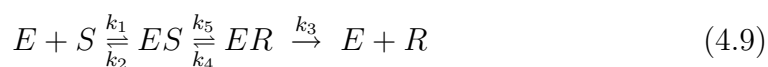
R ... Reaktionsprodukt

Der Quotient $\frac{k_2+k_3}{k_1}$ ist gleich der Dissoziationskonstanten K_m des Enzym-Substrat-Komplexes, d. h. im speziellen Falle des Esterase-Dipivefrin-Komplexes. In diesem Fall bezeichnet man K_m als Michaelis-Konstante. Der in Gleichung 4.7 postulierte Zerfall erfolgt in zwei Schritten gemäß Gleichung 4.8:



ER ... Enzym-Reaktionsprodukt-Komplex

Durch die Zusammenfassung der Gleichungen 4.7 und 4.8 wird die gesamte Komplexität des Vorgangs sichtbar, und man erhält durch die resultierende Gleichung 4.9 einen Überblick über die enzymatischen Abläufe.



Die Hintereinanderschaltung anderer bzw. weiterer enzymatischer Schritte hinsichtlich eines speziellen Abbaus von R (s. Abb. 3.7) im Cornea-Epithelhomogenat (Gl. 4.10) kann auch eine mögliche Erklärung für das spezielle Verhalten (s. Abb. D.15, D.16, D.17 und D.18) der Cyclodextrine sein.



R ... Reaktionsprodukte
 R^x ... Folgeprodukte
 E_n ... weitere Enzyme bzw. Enzymsysteme

Unter Berücksichtigung der in der Tabelle 4.6 wiedergegebenen normierten Reinenzymversuche, die im Durchschnitt bei einem CD:DPE Molverhältnis von 1:1 alle eine Abbausteigerung bzw. Konstanz der Abbauleistung zeigen (es fehlen weitere Enzyme), kann es im Cornea-Epithelhomogenat zu Überlagerungseffekten (Parallel- und Folgereaktionen) kommen.

Neben den bisher genannten, können natürlich weitere Reaktionen für das unterschiedliche Reaktionsverhalten (Dipivefrin-Abbau) in Anwesenheit der Cyclodextrine mit steigender Konzentration verantwortlich sein:

1. Stereochemische Spezifitätsunterschiede [LEUTHARDT 1959], bedingt durch das Einführen zusätzlicher Atomgruppen vom α - zum γ -CD und die Hydroxypropylierung, die dann die Reaktion zwischen Wirkgruppe und Substrat dosisabhängig aktivieren oder inhibieren kann (Veränderung der eigentlichen Wirkungsspezifität, Gruppenspezifität und Substratspezifität).
2. Konstitutionsbedingte unterschiedliche Affinitäten des Substrats in Anwesenheit weiterer anorganischer Stoffe. So wurde bei Esterasen allgemein beobachtet, dass Chloridionen Veränderungen in der Affinität hervorrufen können. Diese anorganischen Stoffe, als Zusatzstoffe teilweise im physiologischen Puffer enthalten, bilden sogenannte „labile Sorptionsverbindungen“, welche die in der Gleichung 4.9 angeführten Teilreaktionen beeinflussen können.
3. Die Konzentrationszunahme innerhalb eines definierten Cyclodextrins kann gleichfalls selektiv ganz verschiedene Bindungen innerhalb des Komplexes verursachen und damit auch unterschiedliche Reaktionen hervorrufen. Hinzu kommt, dass eingeführte Atome und Atomgruppen sowie auch höhere

Konzentrationsverhältnisse gleichfalls zu räumlichen Verzerrungen des Substratmoleküls und somit zu unterschiedlichen Abbauraten führen können. Gleiche Ergebnisse sind auch denkbar, wenn durch Wechselwirkungen zwischen Enzymprotein und Substrat eine reversible Faltung des Enzymproteins und somit die Bildung bzw. Lösung möglicher Wasserstoffbrücken auftritt.

4. Die Veränderung der Zerfallsgeschwindigkeit der gemäß Gleichung 4.9 und 4.10 intermediär gebildeten Esterase-Dipivefrin-Komplexe infolge möglicher Konkurrenzhemmung, Verdrängungshemmung im Sinne kompetitiver Hemmungen (d. h. durch Konzentrationserhöhung der CD wird die kompetitive Hemmung ganz oder teilweise aufgehoben) oder auch durch nichtkompetitive Hemmung von entsprechenden, teilweise veränderten Enzymproteinen sind denkbar. Durch die dadurch hervorgerufene mögliche Verschiebung der Michaelis-Konstanten, d. h. eine Verschiebung z. B. des bei der Dipivefrinlösung ohne CD-Zusatz vorherrschenden Gleichgewichts, kann dann bei CD-Anwesenheit zu langsamerem bzw. schnellerem Umsatz der gebildeten Intermediärkomplexe führen.
5. Abschließend wäre noch die Abhängigkeit der Esterase-Reaktion von Temperaturänderungen (in den vorliegenden Versuchen konstant $33 \pm 0,1$ °C), von pH-Wert-Änderungen während des Abbaus (Zunahme der Hydroniumionen-Konzentration, die nicht durch die Pufferlösung neutralisiert wird), von Redoxpotentialen und letztlich der Einwirkung von Enzymgiften (Inhibitoren) oder Aktivatoren, die z. B. verschiedene bestehende chemisch stabile Bindungen abschwächen können, zu nennen.

Unter diesen genannten Prämissen sind dann auch die tendenziellen und signifikanten Abbau-Hemmungen und -Steigerungen des DPE bei den Systemen Dipivefrin:Cyclodextrin/HP-Cyclodextrin besser verständlich.

Dass bei der Erklärung der gefundenen Effekte sowohl stereochemische Effekte als auch andere reaktionsbeeinflussende Mechanismen auftreten, zeigt der Vergleich der normierten Reinenzym-Auswertungen und der Cornea-Epithel-homogenate (s. Tab. 4.6, 4.5). Sieht man von der α -CD-Gruppe ab, die unter den

Reinenzym-Versuchen keine Steigerung oder Hemmung des DPE-Abbaus bei verschiedenen Konzentration bewirkt, zeigt sich bei allen anderen Cyclodextrinen, dass es bei höheren molaren Verhältnissen als 1:1 grundsätzlich zu einem Abfall des DPE-Umsatzes kommt.

Bei den Versuchen im Homogenat zeigt sich im Gegensatz zu den ButChE-Untersuchungen deutlicher ein Bild sich offensichtlich überlagernder Effekte (z. Zt. wissenschaftlich nicht interpretierbar). Am stärksten macht sich dies bei α - und HP- α -CD bemerkbar, wo sich tendenziell mit steigender Konzentration ein mehrfacher Wechsel von Beschleunigung und Hemmung des Abbaus von DPE einstellt. Bei den anderen CD ergibt sich ein signifikanter Wechsel der Einflussrichtung. Während in niedriger Konzentration (Molverhältnis 1:1) ein beschleunigter Abbau von DPE abläuft, hemmen die CD den DPE-Abbau konzentrationsabhängig. Den stärksten Einfluss zeigt hierbei das HP- β -CD, das den DPE-Umsatz auf 10% reduziert, wobei zu vermuten ist, dass neben den weiter oben genannten möglichen reaktionskinetisch relevanten Einflussfaktoren auch Reaktionen im Sinne der Gleichung 4.10 (s. S. 66) ablaufen.

Eine Aufklärung der genauen Wirkungsmechanismen ist, legt man den derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnistand zu Grunde, äußerst komplex. Zur Abklärung der Fragen, ob die verwendeten unterschiedlichen Cyclodextrine intermediäre Bindungen mit Dipivefrin eingehen, wie stark diese Wechselwirkungen sind und ob es von der CD-Konzentration abhängige Effekte gibt, müssen weitere Untersuchungen mit geeigneten Methoden erfolgen.

Von den untersuchten Cyclodextrinen scheinen nur β - bzw. HP- β -CD geeignet zu sein, relevanten Einfluss auf die Verfügbarkeit von DPE zu nehmen. Für die praktische Anwendung ist nur das in Wasser sehr gut lösliche HP- β -CD geeignet (s. a. [JARHO et al. 1997]). Untersuchungen anderer Autoren demonstrieren die mögliche ophthalmologische Anwendung von HP- β -CD im Zusammenhang auch mit anderen Arzneistoffen (Diclofenac-Na [REER et al. 1994], Indometacin [VAN DOORNE 1993], Pilocarpin-HCl [FREEDMAN et al. 1993], Dexamethason, Dexamethasonacetat [USAYAPANT et al. 1991]).

Kapitel 5

Wechselwirkungen zwischen Dipivefrin und Cyclodextrinen

5.1 Allgemeine Bemerkungen

Cyclodextrine sind, wie bereits ausgeführt (s. Kap. 3.2.2 ab S. 42), besonders interessant, da die apolare Kavität in der Lage ist, apolare Moleküle und Molekülteile von Substanzen einzuschließen, passende molekulare Dimensionen vorausgesetzt. Für den Nachweis solcher Wechselwirkungen sowie deren Quantifizierung und Charakterisierung existieren eine Vielzahl von Methoden und Verfahren. Zu unterscheiden sind Untersuchungen an festen oder in Lösung befindlichen Komplexen. Erstere können speziell für die Analytik hergestellt oder aus den verwendeten Versuchslösungen isoliert werden. Gewünscht ist häufig, die Wechselwirkungen direkt in wässriger Lösung zu charakterisieren (s. a. [KEIPERT et al. 1996]). Eine Zusammenstellung möglicher Methoden gibt Tabelle 5.1.

Für die sich aus der Problemstellung der Arbeit ergebende Aufgabe, die Wechselwirkungen zwischen den CD und DPE nachzuweisen, wurden ausschließlich Verfahren ausgewählt, die einen direkten Nachweis der Wechselwirkung und, wenn mit den Methoden möglich, eine Quantifizierung und Charakterisierung in der wässrigen Phase zuließen. Durch diesen Ansatz soll der Tatsache Rechnung getragen werden, dass die vorher durchgeführten enzymatischen Versuche

Tabelle 5.1: Methoden zum Nachweis und zur Charakterisierung von Wechselwirkungen von Cyclodextrinen mit Arzneistoffen

In der Festphase	In wässriger Lösung
Röntgendiffraktometrie	^1H -NMR-Spektroskopie
FT-IR-Spektroskopie	^{13}C -NMR-Spektroskopie
Differenzthermoanalyse	Ultrafiltration
Elektronenmikroskopie	UV/VIS-Spektroskopie
Röntgenstrukturanalyse	HPLC-Methoden
	Leitfähigkeitsmessung
	FT-IR-Spektroskopie
	Löslichkeitsbestimmung

in Pufferlösungen stattfanden und sich so eine bessere Korrelation erreichen lässt als durch die Herstellung von festen Komplexen.

5.2 Membranverfahren: Ultrafiltration

5.2.1 Allgemeine Bemerkungen

Die Ultrafiltration (häufig in Form eines Zentrifugalverfahren durchgeführt), vielfach für Bindungsstudien von Arzneistoffen an Serumprotein verwendet [WHITLAM und BROWN 1981, JERKUNICA et al. 1980, HAMMOND et al. 1980, SHAH et al. 1974], ist ein membrangestütztes Trennverfahren, das für die Wechselwirkungsuntersuchungen zwischen einem Arzneistoff und Cyclodextrinen geeignet ist. Zu dieser Verfahrensgruppe zählen des Weiteren die Umkehrosmose, die Gleichgewichtsdialyse und die Mikrofiltration.

Bei der Umkehrosmose werden niedermolekulare Stoffe ($M_r < 100$) durch hohe Drücke an semipermeablen Membranen getrennt. Als Maß für die Trennfähigkeit wird üblicherweise die NaCl-Rückhaltekapazität angegeben. Bei der Gleichgewichtsdialyse werden die Diffusionsunterschiede von Substanzen aus der Probe durch eine Membran in das Dialysat bestimmt [MACGREGOR und SAR-

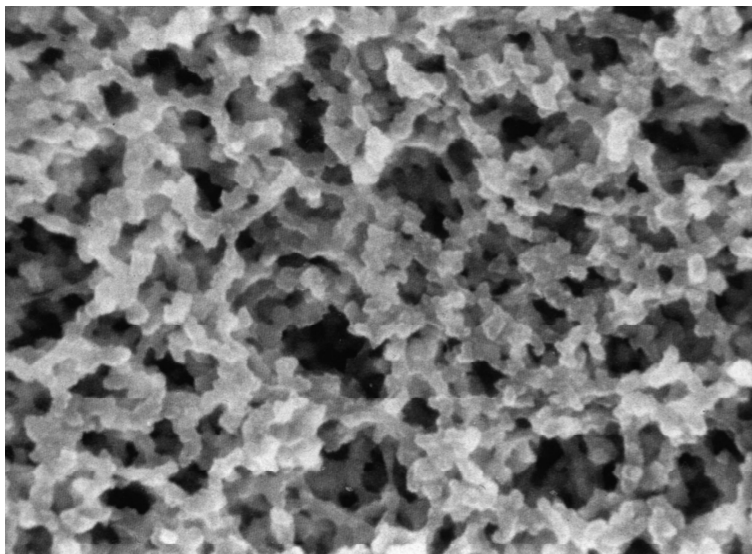


Abbildung 5.1: Querschnitt durch eine mikroporöse Membran. Partikel werden an der Oberfläche oder in der porösen Matrix zurückgehalten. Elektronenmikroskopische Aufnahme aus [AMICON, INC. 1995]

DI 1991, NIMMO et al. 1977, CHRAI und ROBINSON 1976]. Die Durchtrittsrate ist proportional abhängig von der Aktivität des zu untersuchenden Stoffes und umgekehrt proportional von dessen Molekulargewicht. Mikrofiltrationen werden üblicherweise mit mikroporösen starren Membranen mit einer definierten Porengröße durchgeführt (s. Abb. 5.1). Hierbei werden Partikel mit einem Durchmesser $> 0,1 \mu\text{m}$ durch die Oberflächen- (Sieb-) und Tiefenfiltration an der Membran zurückgehalten. Zur Bestimmung von Wechselwirkungen zwischen Arzneistoffen und Cyclodextrinen ist dieses Verfahren allerdings ungeeignet.

Demgegenüber passieren bei der Ultrafiltration alle Stoffe unterhalb einer membranspezifischen Molekulargewichts-Trenngrenze (MWCO: molecular weight cutoff) die Membran. Hierbei spielt die jeweils vorliegende Konzentration der Lösung keine Rolle. Die Ultrafiltration gilt im Vergleich zu der dieselben Resultate liefernden Gleichgewichtsdialyse als einfacher und schneller handhabbar [SOPHIANOPOULOS et al. 1978]. Selbst die in der chemischen Verfahrenstechnik häufig angewandte kontinuierliche Ultrafiltration, meist als cross-flow-Verfahren betrieben, lässt sich als Analysenmethode nutzen [CAMPION und OLSEN 1974].

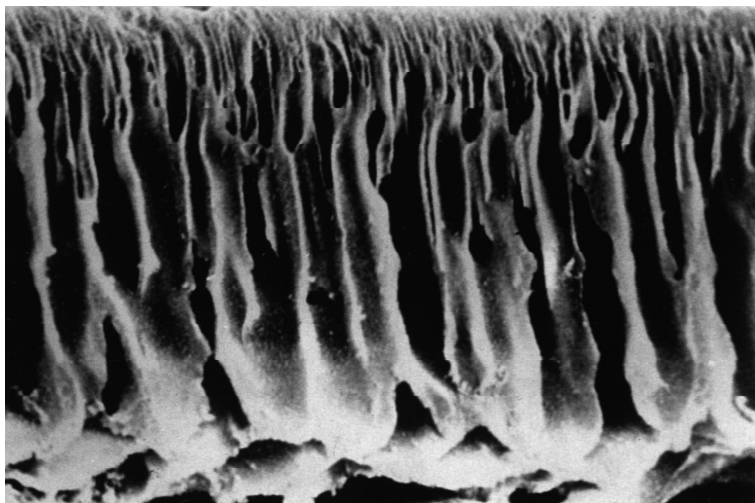


Abbildung 5.2: Querschnitt durch eine anisotrope Ultrafiltrationsmembran Amicon® von Millipore. Die „Ultrafiltrationshaut“ auf der Membranoberfläche (im Bild oben) ist sehr dünn und nahezu unsichtbar. Die offenzellige Struktur (sog. Fingerstruktur) darunter ist hochpermeabel. Elektronenmikroskopische Aufnahme aus [AMICON, INC. 1995]

Als Ultrafiltrationsmembran kam im vorliegenden Fall eine zweischichtige anisotrope Membran (s. Abb. 5.2) zum Einsatz. Dabei handelt es sich um eine asymmetrische Membran, die vereinfacht als Zwei-Zonen-System angesehen werden kann. Das System besteht aus einer sehr dünnen aktiven Schicht, einer Oberschicht mit Poren definierten Durchmessers, die somit die Molekulargewichtstrenngrenze der Oberflächenfiltration bestimmt, und einer wesentlich dickeren porösen Stützschrift, deren Porengröße zur Permeatseite hin zunimmt und damit sicherstellt, dass keine Tiefenfilterwirkung durch die Gesamtmembran eintritt und der Permeatfluss unabhängig vom jeweils angelegten Druck ist und keinen Einfluss auf den Filtrationsvorgang ausübt.

Dieses Verfahren wird angewendet, wenn nur einer der Wechselwirkungspartner die Membran passieren kann. Entstehen intermolekulare Verbindungen, so sind diese Assoziate auf Grund ihrer Molekülgröße ebenfalls nicht filtrierbar. Lediglich der freie Anteil der niedermolekularen Verbindungen behält seine Durchtrittsmöglichkeit. Da diese zumeist reversiblen Wechselwirkungen eine Gleichgewichtsreaktion ($A + B \rightleftharpoons AB$) darstellen, ist die Lage des Gleichgewichts und

damit der Anteil an freier passagefähiger Substanz, die im Filtrat quantifizierbar ist, ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung.

5.2.2 Theoretische Betrachtungen

Um Wechselwirkungen zwischen zwei Substanzen durch Filtration bestimmen zu können, ist eine Trennmembran notwendig, deren molekulare Ausschlussgrenze zwischen den relativen Molekülmassen (M_r) der zur Untersuchung anstehenden Substanzen liegt. Die MWCO gibt hierbei das Molekulargewicht eines globulären Proteins an, das zu 90 % von der jeweiligen Membran zurückgehalten wird. Zwischen DPE ($M_r=387$) und den CD-Molekülen, das kleinste ist α -CD mit einer M_r von 972, kam eine Membran mit einem MWCO von 500 zur Anwendung.

Die angegebene Trenngrenze ist kein absolutes Maß. Bei allen Substanzen, die nicht dem oben genannten Kriterium „globuläres Protein“ entsprechen, ist mit einem verändertem Rückhaltevermögen zu rechnen. Neben den Parametern Porengröße, Porengeometrie, den Materialeigenschaften des Filters und dem Lösungsmittel ist die reale Trenngrenze in hohem Maße abhängig von der Molekülgeometrie und Ladung der zu trennenden Stoffe. Dabei ist davon auszugehen, dass auch Moleküle mit einer M_r unterhalb der MWCO am Durchtritt behindert werden und zwar um so mehr, je dichter sich ihre M_r dem MWCO nähert. Ebenso ist ein Durchtritt größerer Moleküle durch den Ultrafilter nicht auszuschließen. Als Richtwert sollte die molare Masse des zurückzuhaltenden Stoffes 2,5 mal höher sein als der angegebene MWCO der Membran. Das kleinste CD (α -CD, $M_r=972$) besitzt ein annähernd doppelt so großes Molekulargewicht wie die MWCO. Deshalb ist bei einer Membran mit einem MWCO von 500 zu vermuten, dass zumindest α -CD im begrenzten Maße die Membran passieren kann. Diese Grenzfälle sind zu überprüfen und ggf. in die Bewertung der Ergebnisse aufzunehmen.

Auch während eines diskontinuierlichen Ultrafiltrationsvorganges, bei dem es im Retentat zu einem Anstieg der Konzentration der zurückgehaltenen Komponente kommt, ändern sich die Bindungsgleichgewichte nur unwesentlich. Nach den Arbeiten von Kwong ist die Wirkstoffkonzentration im Ultrafiltrat relativ konstant und entspricht dem Anteil an ungebundenen Wirkstoff, vermindert um die membranbedingten Filtrations- und Adsorptionsverluste [KWONG 1985].

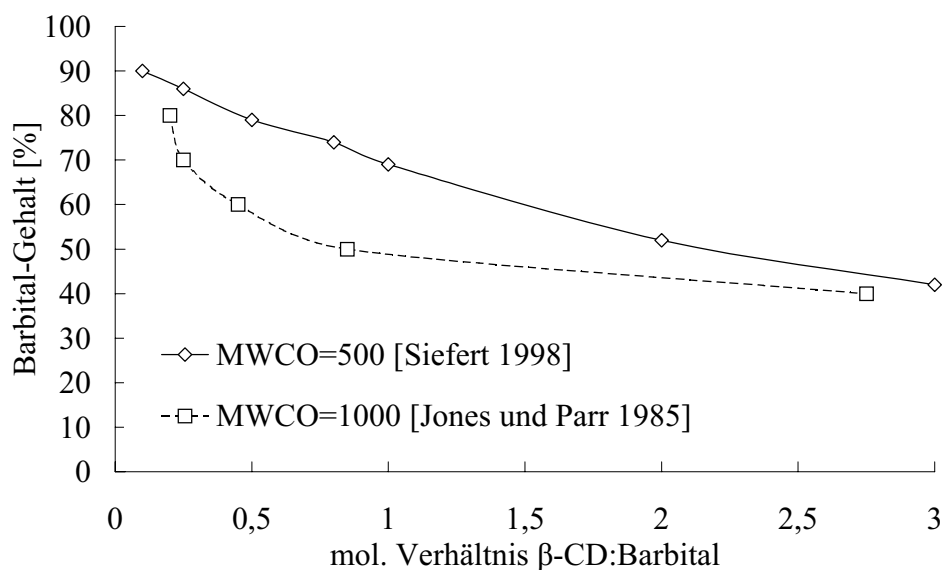


Abbildung 5.3: Konzentration von Barbitol im Permeat der Ultrafiltration unter Einfluss steigender Konzentrationen von β -CD

Die Transportvorgänge an einer zweischichtigen Membran basieren grundsätzlich auf einem vierschichtigen Transportmodell (s. Kap. 7.2.4.8, S. 124), den unterschiedlich strukturierten Membranschichten und den Konzentrationsgrenzschichten auf beiden Seiten der Membran. Wie schon unter 5.2.1 ausgeführt, versucht man, durch geeignete Strukturen der passiven Schicht auf der Permeatseite der Membran den Einfluss der dort angelagerten Grenzschicht zu minimieren.

Zum Nachweis der Wechselwirkungen zwischen Arzneistoffen und Cyclodextrinen wurden Versuche u. a. mit Barbitol/ β -CD durchgeführt [SIEFERT 1998, JONES und PARR 1985]. Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen sind in Abbildung 5.3 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, obwohl unstrittig eine Wechselwirkung zwischen Barbitol und β -CD bewiesen wurde, dass schon die Wahl eines anderen Ultrafilters (Siefert: MWCO=500, Jones und Parr: MWCO=1000) zu deutlich anderen Kurvenverläufen und Interpretationen führt.

Auch mit anderen Arzneistoffen wurden entsprechende Untersuchungen mit Hilfe von Ultrafiltrationsmembranen durchgeführt, u. a. mit Spironolacton/ β - und γ -CD [YUSUFF und YORK 1991], mit Warfarin/ β -CD [LIN und YANG 1987] und mit Pilocarpin/ α -, HE- β - und HP- β -CD [SIEFERT 1998].

Insbesondere bei der Ultrafiltration kommt es häufig vor, dass der Strömungswiderstand R nicht nur vom hydraulischen Widerstand der Membran R_M , sondern auch vom hydraulischen Widerstand der sich bildenden Konzentrationsgrenzschicht R_G determiniert wird. Der als Konzentrationspolarisation (Theorie s. a. [NÄSER 1986, POHL 2000]) bezeichnete Effekt beeinflusst den Flux J des Lösungsmittels nach Gleichung 5.1:

$$J = \frac{\Delta p - \pi}{R_M + R_G} \quad (5.1)$$

Δp ... transmembrane Druckdifferenz
 π ... osmotischer Druck der Lösung

Gebildet wird die Konzentrationsgrenzschicht durch den Fluss des Lösungsmittels in Richtung Membran und die dort stattfindende Anreicherung der zurückgehaltenen Komponente (hier: Cyclodextrine). Es entsteht eine Art Gelschicht auf der Membran. Der hydraulische Widerstand der sich bildenden Grenzschicht ist in niedrigen Konzentrationen linear abhängig von der Konzentration der zurückgehaltenen Komponente. Daher ist mit einer linear von der CD-Konzentration abhängenden Verringerung des Permeatflusses zu rechnen.

Bei starker Aufkonzentrierung des CD in der Grenzschicht (besonders gefördert durch eine hohe CD-Konzentration im Retentat) kommt es durch Erreichen und Überschreiten der Sättigungskonzentration der zurückgehaltenen Komponente zur Bildung einer Deckschicht durch Scaling. Die Stärke der Schicht ist demnach abhängig von der CD-Konzentration. Diese Deckschicht bildet eine zusätzliche, in den Filtrationsprozess eingreifende Membranfläche. (Dieser Deckschicht ist aus den oben genannten Gründen wieder eine Konzentrationsgrenzschicht aufgelagert.) Dadurch verringert sich der Flux J nun zusätzlich proportional zur Konzentration der zurückgehaltenen Komponente und der sich bildenden Deckschicht. Die Gleichung 5.1 muss um den hydraulische Widerstand der Deckschicht R_D ergänzt werden (Gl. 5.2):

$$J = \frac{\Delta P - \pi}{R_M + R_G + R_D} \quad (5.2)$$

Die Wirkstoffkonzentration im Ultrafiltrat (s. o.) entspricht prinzipiell weiterhin dem Anteil des ungebundenen Wirkstoffs, allerdings kommt zur Verminderung um die membranbedingten Filtrations- und Adsorptionsverluste ein weiteres Verlustmodul hinzu. Dieses besteht aus den Filtrations- und Adsorptionsverlusten der Deckschicht. Wie oben erwähnt, sind die Dicke der Deckschicht und damit die durch sie verursachten Verluste eine Funktion der Konzentration der zurückgehaltenen Komponente, d. h. im Permeat sinkt die Arzneistoffkonzentration linear mit steigender CD-Konzentration. Dafür ist keine Wechselwirkung Arzneistoff/Cyclodextrin notwendig. Eine Verminderung der Arzneistoffkonzentration linear zur eingesetzten Cyclodextrinmenge ist daher kein sicheres Zeichen für eine Wechselwirkung. Zusätzlich kann es durch Kristallisationen in der aktiven Schicht der Membran zu irreversiblen Schäden an der Membranstruktur kommen. Bei einem wiederholten Einsatz derselben Membran würde sich dies durch veränderten Flux und veränderte Verluste an der Membran widerspiegeln.

5.2.3 Versuchsdurchführung

Die Durchführung erfolgte mit einer Ultrafiltrationszelle (micropartition system MPS-1, Amicon[®], Beverly, USA). Bestückt war die Zelle mit einer hydrophilen Amicon[®] Ultrafiltrations-Membran YC05 (Millipore[®], Bedford, USA) mit einem MWCO von 500.

Als Substrate kamen wässrige Lösungen zum Einsatz. Die DPE-HCl-Konzentration war für die Versuche mit und ohne CD jeweils konstant. Die Cyclodextrine wurden in definierten molaren Verhältnissen zu DPE zugesetzt. Zur Prüfung der Passage des jeweiligen CD durch den Filter wurden wiederholte Versuche mit einheitlicher Eingangskonzentration durchgeführt und die CD-Konzentration polarimetrisch im Filtrat bestimmt (s. Anh. A.1.3, S. 175).

Um die Substanzbelastung der Filter durch Scaling (s. o.) gering zu halten, wurde von der für die enzymatischen Versuche verwendeten Konzentration von $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ abgewichen und mit einer geringeren DPE-HCl-Konzentration von $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($= 2,58 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) gearbeitet. Wechselwirkungen finden konzentrationsabhängig statt; erfahrungsgemäß sind sie in verdünnten Lösungen stärker. Die CD wurden in folgenden molaren Verhältnissen CD:DPE zugesetzt: 0,5:1, 1:1,

2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 12:1 und 16:1; das entspricht Konzentrationen von 0,129 bis 4,128 mmol·l⁻¹. Als Ausgangs- und Vergleichswert wurden sechs Proben ohne Zusatz von CD bearbeitet. Damit wurde gleichzeitig der Anteil DPE bestimmt, der unter den gegebenen Bedingungen von dem verwendeten Filtermaterial zurückgehalten wird.

Zu je 10 ml DPE-Lösung ($2,58 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹) wurden die den molaren CD:DPE-Verhältnissen entsprechenden Mengen an CD zugesetzt. Für jede Konzentration wurden je drei Proben hergestellt und bei 33 °C 30 min geschüttelt. Die gemäß Herstellervorschrift gewässerten Filter wurden in die Filtrationszellen eingelegt, die Zellen anschließend vormontiert und mit je 1,0 ml der inkubierten Proben beschickt. Danach wurden die Filtrationszellen verschlossen und in die Zentrifuge eingesetzt. Es wurde ein Filtrationsvorlauf (5 min bei 5000 min⁻¹) erzeugt, um das Wasser aus der Vorbehandlung der Filter zu entfernen. Der Vorlauf wurde verworfen. Anschließend begann die Filtration während 30 min bei 5000 min⁻¹ und 33 °C. Die Quantität der Ultrafiltrate wurde durch Wägung ermittelt und der Gehalt an DPE mittels UV-Spektrometrie (220 nm) gemessen (s. [A.1.1](#), S. 174).

5.2.4 Ergebnisse

5.2.4.1 Filtermaterial

Eine Reinigung und Spülung der Ultrafilter nach Herstellervorschrift im Anschluss an den Filtrationsprozess zwecks Wiederverwendung führte nicht zu denselben Leistungsparametern wie bei der Erstverwendung. Für die vorher mit CD-haltigen Lösungen belasteten Filter betrugen die gemessenen Permeatmengen für die CD-freien Ultrafiltrate 0,15–0,25 ml nach 30 min. Im Vergleich dazu lag die Permeatmenge für neue Filter bei 0,47–0,50 ml. Die in der Erstverwendung mit CD-freien Lösungen belasteten Filter erreichten dagegen ohne signifikanten Unterschied ihre Ausgangskennwerte. Daher ist aus dem oben genannten zu schlussfolgern, dass eine Beschädigung der Ultrafiltrations-Membran stattgefunden hat. Diese erfolgte nicht durch die mechanische Belastung des Filtrationsvorganges selbst, sondern durch eine Beschädigung infolge eines Scalings und damit verbunden einer Deckschichtbildung aus Cyclodextrinen. Die durch Überschreitung

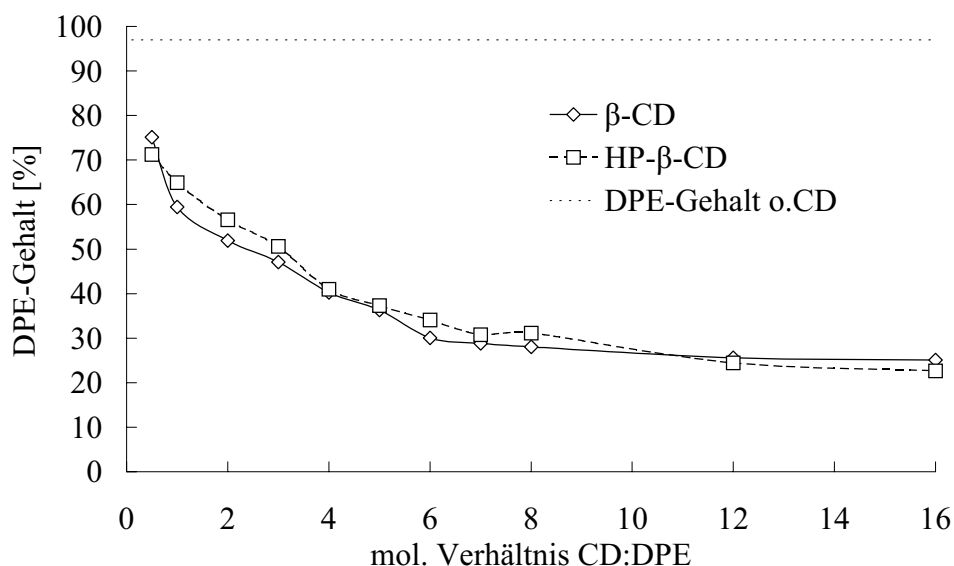


Abbildung 5.4: Konzentration von DPE im Permeat der Ultrafiltration unter Einfluss steigender Konzentrationen von β - und HP- β -CD, \bar{x} , $s_{rel} \leq 0,63\%$, $n=3$

der Sättigungskonzentration in der Grenzschicht und am bzw. in der Membran ausfallenden Cyclodextrine führten zu einer irreversiblen Schädigung der Membran.

5.2.4.2 Dipivefrin-Konzentration im Permeat

Der Zusatz von β -CD führte zu einer signifikanten und, gemessen an der CD-Konzentration, überproportionalen Abnahme der Dipivefrin-Konzentration im Ultrafiltrat. Der DPE-Gehalt im Filtrat ohne Zusatz von Cyclodextrin lag bei 97 % der Retentat-Konzentration und sank bei einem molaren Verhältnis von 1:1 auf $\approx 59\%$. Bei einem molaren Verhältnis von 7:1 waren nur noch 29 % der Ausgangskonzentration messbar. Danach wurde offenbar eine „CD-Sättigung“ erreicht. Aus einer weiteren Steigerung der CD-Konzentration bis zum molaren Verhältnis 16:1 resultierte lediglich noch eine geringe weitere Absenkung der DPE-Konzentration auf 25 % der Ausgangskonzentration (Abb. 5.4). Annähernd dieselben Ergebnisse lieferten die Untersuchungen mit HP- β -CD. Die DPE-Konzentration war hier bei einem molaren Verhältnis von 16:1 auf 23 % reduziert.

Die Untersuchungen der restlichen Cyclodextrine (α -, HP- α , γ - und HP- γ -CD)

zeigten eine wesentlich geringere Abnahme der DPE-Konzentration im Permeat bis zu einer Restkonzentration von 66–75 % beim molaren Verhältnis CD:DPE von 16:1. Die grafische Darstellung der Ergebnisse (Abb. D.19, D.20) hierfür erfolgt im Anhang D ab S. 195. Die Abnahme verläuft linear zur eingesetzten CD-Konzentration ($r^2=0,74-0,86$). Wesentliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen von α -, HP- α -, γ - bzw. HP- γ -CD sind nicht festzustellen.

5.2.4.3 Permeatfluss

Bei den durchgeführten Ultrafiltrationen war eine Verminderung des Permeatflusses mit steigender CD-Konzentration deutlich nachweisbar. Die Permeatmenge nach dem Filtrationsprozess von 30 min von 0,47–0,50 ml für die CD-freie Ultrafiltration verminderte sich auf 0,32–0,36 ml durch den Einsatz von CD im molaren Verhältnis 16:1. Wie in den Abbildungen D.21, D.22 und D.23 ab Seite 196 dargestellt, verringert sich die Permeatmenge für α -, β - und γ -CD sowie ihr Derivate in einem annähernd linearen Verhältnis zur eingesetzten Cyclodextrinmenge. Unterschiede zwischen den einzelnen Cyclodextrinen sind weder in Hinblick auf das Ausmaß der Abnahme des Permeatflusses noch auf den Endpunkt im Bereich der höchsten CD-Konzentration erkennbar. Unterschiede der CD hinsichtlich ihrer Molekülgröße haben daher für das Verfahren keine Relevanz.

5.2.4.4 Cyclodextrin-Durchtritt durch die Membran

Mit Hilfe der Polarimetrie (s. Anh. A.1.3, S. 175) wurde der Cyclodextrinanteil bestimmt, der in der Lage ist, selbst bei einem MWCO von 500 die Filtermembran zu passieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Ergebnisse des Cyclodextrin-Durchtritts durch die Ultrafiltrationsmembran, Angabe der permeierten CD-Menge in Prozent der Gesamtmenge CD in der Ausgangslösung auf der Retentatseite

	CD-Durchgang [%]
α -CD	$6,21 \pm 0,31$
HP- α -CD	Spuren unterhalb des Messbereichs
β -CD	nicht nachweisbar
HP- β -CD	nicht nachweisbar
γ -CD	nicht nachweisbar
HP- γ -CD	nicht nachweisbar

5.2.5 Diskussion

Wie bereits erläutert, lassen Schäden am Filtermaterial auf ein Auskristallisieren von Cyclodextrinen in der Konzentrationsgrenzschicht unter Bildung einer Deckschicht schließen. Bei denen vom Hersteller für die Wiederverwendung konzipierten Filtern muss daher eine durch die CD hervorgerufene strukturelle Schädigung angenommen werden. Es kam zur Aufkonzentrierung der Cyclodextrine, die in Konzentrationen von $0,129\text{--}4,128\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ eingesetzt wurden, bis über die Sättigungslöslichkeit hinaus. Die entstandenen Kristalle führten offenbar zur mechanischen Beschädigung der sehr dünnen aktiven Poren-Schicht.

Der Filtrationsvorgang wird daher sowohl von einer Konzentrationspolarisation der CD als auch von der Ausbildung einer Deckschicht von ausgefallenem CD bestimmt. Wie bereits unter 5.2.2 ausgeführt, resultiert daraus eine linear konzentrationsabhängige Abnahme des Flux bei der Ultrafiltration. Dieser Effekt konnte für alle verwendeten Cyclodextrine (α -, β -, γ -CD und ihre hydroxypropylierten Derivate) nachgewiesen werden.

Bei β - und HP- β -CD-Zugabe kommt es zu einer deutlichen Abnahme der DPE-Konzentration im Permeat. Schon mit geringen CD-Konzentrationen (molares Verhältnis CD:DPE von 1:1 und 2:1) lässt sich eine wesentliche Reduktion der DPE-Konzentration feststellen. Somit liegt ein deutlicher Hinweis auf eine

CD:DPE-Wechselwirkung vor. Des Weiteren ist ab einer Konzentration, die dem molaren Verhältnis 7:1 entspricht, ein „Sättigungsbereich“ zu erkennen. Bei einem höheren molaren Verhältnis kommt es nur noch zu einer unwesentlichen Verminderung der DPE-Konzentration. Eine weitere Verschiebung des Wechselwirkungsgleichgewichts zwischen DPE und CD zuungunsten des freien DPE ist vermutlich aus sterischen Gründen nicht mehr möglich. Ein ähnlicher Kurvenverlauf wurde oben bereits in Abbildung 5.3 nach den Werten von Jones und Parr bis zu einem molaren Verhältnis von 3:1 dargestellt, die damit eine β -CD/Barbital Wechselwirkung nachwiesen [JONES und PARR 1985].

Für α -, HP- α -, γ - und HP- γ -CD findet mit steigender CD-Konzentration im Vergleich zu β - und HP- β -CD ein geringer Rückgang der DPE-Konzentration im Permeat statt. Es stellt sich eine lineare Abnahme der DPE-Konzentration in Abhängigkeit von der zugesetzten CD-Konzentration ein. Der Nachweis einer Wechselwirkung zwischen DPE und α -, HP- α -, γ - bzw. HP- γ -CD war mittels Ultrafiltration daher nicht möglich. Kritisch ist deshalb auch die Interpretation des Kurvenverlaufs in Abbildung 5.3 nach den Werten von Siefert zu sehen, die nur auf Grund der Gesamtstärke des Konzentrationsrückganges als CD/Barbital-Wechselwirkung interpretiert wurde [SIEFERT 1998]. Es zeigt sich dort eine von der CD-Konzentration linear abhängige Verminderung der Barbitalkonzentration im Filtrat; wie unter 5.2.2 ausgeführt, ist dieser lineare Rückgang kein ausreichender Beweis für eine Wechselwirkung. Ein starker Rückgang der Barbital-Konzentration im Permeat kann aus den in Kap. 5.2.2 genannten Gründen seine alleinige Ursache in der Bildung einer dicken Polarisationsgrenz- und Deckschicht haben, bedingt durch die dort eingesetzten hohen Konzentrationen in den Ausgangslösungen von Pilocarpin ($11,1\text{--}22,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) und HP- β -CD ($5,55\text{--}133,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

5.3 Chromatographisches Verfahren: HPLC

5.3.1 Allgemeine Bemerkungen

Ziel chromatographischer Verfahren ist der qualitative und/oder quantitative Nachweis von Stoffen durch Trennung von Stoffgemischen. Erstmals wurde ein

chromatographisches Verfahren von Tswett 1902 zur Trennung von Blattfarbstoffen verwendet. Das Grundverfahren, die Wechselwirkung zweier nichtmischbarer Phasen, ist bis zur modernen Hochleistungs-Flüssigchromatographie unverändert geblieben. Eine der Phasen, die mobile Phase, transportiert das Untersuchungsgut über die zweite, die stationäre Phase. Dabei finden meist Verteilungs- und Adsorptionsvorgänge statt, und auch das Prinzip des Größenausschlusses findet Anwendung.

5.3.2 Theoretische Grundlagen

Durch die Befähigung der CD, mit Gastmolekülen Komplexe zu bilden, die unterschiedliche Stabilitäten aufweisen, bietet sich ihre Anwendung in der Chromatographie an. Dabei können die CD sowohl immobilisiert als stationäre Phase, als auch gelöst in der mobilen Phase eingesetzt werden. Beide Verfahren besitzen sowohl Vor- als auch Nachteile. Für die Untersuchung mehrerer Cyclodextrine bietet sich die Variante der cyclodextrinhaltigen mobilen Phase an, da hierbei für alle Untersuchungen dieselbe Trennsäule verwendet werden kann.

Die CD/Arzneistoff-Komplexe bilden sich in der mobilen Phase. Besitzt der Komplex eine vom freien Gastmolekül verschiedene Polarität, dann ist eine Retentionszeitverschiebung die Folge, deren Größe von der Polaritätsdifferenz, der eingesetzten CD-Konzentration und der Komplexstabilität abhängt [DOBOWSKI et al. 1982]. Die Beschreibung der Komplexstabilität erfolgt durch die Komplexstabilitätskonstante K_S . Für chromatographische Verfahren haben Uekama et al. an den Beispielen α - bzw. β -CD/Prostaglandin (Anionenaustauschersäule) eine Berechnungsmöglichkeit (GL. 5.3) für die K_S der Komplexe vorgestellt [UEKAMA et al. 1977, UEKAMA et al. 1978].

$$\frac{c_{CD}}{t_0 - t_{obs}} = \frac{1}{t_0 - t_C} \cdot c_{CD} + \frac{1}{K_S \cdot (t_0 - t_C)} \quad (5.3)$$

- c_{CD} ... Konzentration des CD
 t_0 ... Retentionszeit ohne CD
 t_{obs} ... Retentionszeit einer bestimmten CD-Konzentration
 t_C ... Retentionszeit des CD-Komplexes

In der Folge wurden von anderen Autoren weitere rechnerische Ansätze zur Ermittlung von K_S beschrieben [ZUKOWSKI et al. 1985, MOHSENI und HURTUBISE 1991]. Voraussetzung für die Berechnungen nach den von den Autoren angegebenen Gleichungen ist die Verwendung rein wässriger Medien. Bei mobilen Phasen, die daneben noch organische Lösungsmittel enthalten, muss eine kompetitive Verdrängung des Gastmoleküls vom Cyclodextrin berücksichtigt werden. Dadurch verringert sich der Anteil des freien Cyclodextrins, das für die Komplexbildung des Gastmoleküls verfügbar ist. Zur Korrektur wäre die Kenntnis der Stabilitätskonstante des Lösungsmittel/CD-Komplexes notwendig. Für mobile Phasen aus Methanol/Wasser und Ethanol/Wasser haben Mohseni und Hurtubise die Stabilitätskonstanten für Methanol/ β -CD und Ethanol/ β -CD ermittelt [MOHSENI und HURTUBISE 1990]. Mit Hilfe der von ihnen aufgestellten Gleichung (Gl. 5.4) lässt sich der Anteil des freien CD berechnen.

$$c_{CD,eff} = \frac{c_{CD}}{1 + (K_{S_L} \cdot c_L)} \quad (5.4)$$

- $c_{CD,eff}$... effektive Konzentration des CD
 c_{CD} ... absolute Konzentration des CD
 K_{S_L} ... Stabilitätskonstante des Lösungsmittel/CD-Komplexes
 c_L ... Konzentration des organischen Lösungsmittels

Die Berechnung der Stabilitätskonstanten für Arzneistoff/CD-Komplexe setzt demnach ein chromatographisches System voraus, das mit einer rein wässrigen

mobilen Phase oder mit einer H₂O/Methanol- bzw. H₂O/Ethanol-Phase arbeitet. Weiterhin sollte die stationäre Phase keine Wechselwirkungen mit dem CD zeigen bzw. müssten ggf. die Stabilitätskonstanten des Systems CD/stationäre Phase bekannt sein. Besonders die erstgenannte Bedingung dürfte für eine Vielzahl von Arzneistoffen den Ausnahmefall darstellen.

Untersuchungen zur Veränderung der Wasserstruktur durch die CD und zu additiven Wechselwirkungen der CD im Verhältnis zum RP-18 Säulenmaterial wurden orientierend von Hanke durchgeführt [HANKE 1993]. Dabei war eine gegenseitige Verstärkung von Effekten durch die CD nicht zu beobachten, wodurch eine Veränderung der Wasserstruktur ausgeschlossen wurde. Die Retentionszeiten verkürzten sich bei gleichzeitigem Einsatz mehrerer CD um den Betrag des in Einzeluntersuchungen gefundenen CD mit dem stärksten Effekt. Hanke vermutete daher eine Konkurrenzreaktion der CD um die Arzneistoffe. Die möglichen Einflussfaktoren Oberflächenspannung und Viskosität, die durch Cyclodextrine beeinflusst werden können, sind nach Untersuchungen von Debowski und Sybilska für wässrige CD-Lösungen im vorliegenden Konzentrationsbereich zu vernachlässigen [DOBOWSKI und SYBILSKA 1982].

5.3.3 Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung der Wechselwirkung zwischen CD und RP-18-Säulenmaterial eignet sich zur Detektion der CD ein in das System integrierter Brechungsindex-detektor (s. Anh. B S. 180). Zum Vergleich diente die Bestimmung der Totzeit des HPLC-Systems mit KCl.

Für die chromatographischen Untersuchungen wurde die Methode zur Gehaltsbestimmung von DPE (s. Anh. A.1.2 S. 174) abgewandelt. Wie in Vorversuchen ermittelt, erwies sich eine längere Retentionszeit als bei der Gehaltsbestimmung genutzt, als besser geeignet, um die Laufzeitunterschiede von DPE unter CD-Einfluss zu ermitteln. Das beste Ergebnis erbrachte eine Zusammensetzung der mobilen Phase Acetonitril:Phosphatpuffer pH 2,0 von 25:75. Eine weitere Verlängerung der Nettoretentionszeit über 16 min hinaus führte zu einer Verschlechterung (Peak-Verbreiterung und Tailing) des DPE-Signals.

Da die Voraussetzungen für eine Bestimmung von K_S nicht gegeben waren — in der Literatur nur für rein wässrige oder methanolische bzw. ethanolische Lösung beschrieben — wurde auf die Ausführung von CD-Konzentrationsreihen verzichtet und nur eine CD-Konzentration ($2,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) eingesetzt.

Zwischen den einzelnen Messreihen der Cyclodextrine (α -, HP- α -, β -, HP- β -, γ - und HP- γ -CD), in deren Anwesenheit die Retentionszeit von DPE jeweils dreimal bestimmt wurde, wurde mit CD-freiem Laufmittel die stationäre Phase ausgiebig gespült und die Retentionszeit von DPE ohne CD-Zusatz erneut bestimmt. Veränderungen an der stationären Phase wären damit durch mögliche Abweichungen von der Retentionszeit des DPE am Beginn der Versuche zu erkennen.

Um sicherzustellen, dass die Cyclodextrin-Struktur und nicht das gemeinsame Strukturelement, die Glucose, die Wechselwirkung und damit eine Verringerung der Retentionszeit bewirkt, wurde die Retentionszeit von DPE mit glucosehaltigen mobilen Phasen gemessen. Es wurden die molaren Mengen an Glucose eingewogen, die dem Anteil an Glucosebausteinen von α -, β - und γ -CD in einer 2-mM-Lösung entsprachen (d. h. 12; 14 und $16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Auch die Glucose wurde auf Wechselwirkungen mit der stationären Phase überprüft. Dabei wurde analog dem Verfahren zur Überprüfung der einzelnen CD vorgegangen (s. o.).

5.3.4 Ergebnisse

Mit Hilfe eines Brechungsindex-Detektors am HPLC-System konnte nachgewiesen werden, dass alle verwendeten CD und die eingesetzte Glucose, die in eine CD-freie mobile Phase injiziert wurden, die verwendete RP-18-Trennsäule zur mit KCl bestimmten Totzeit verlassen. Eine Wechselwirkung zwischen der stationären Phase und den CD bzw. der Glucose ist damit auszuschließen. Die Retentionszeit von DPE wurde durch Glucose in den Konzentrationen von 12, 14 und $16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht signifikant beeinflusst.

Die Messung der nicht durch CD beeinflussten Retentionszeit von DPE ergab als Ausgangs- und Vergleichspunkt für die späteren Versuche eine Gesamtretentionszeit von $16,47 \pm 0,089 \text{ min}$ bei einer Totzeit des Systems von $0,69 \text{ min}$. Die

Tabelle 5.3: Nettoretentionszeiten und Kapazitätsverhältnisse von DPE in Abhängigkeit von verschiedenen Cyclodextrinen in der mobilen Phase und deren relative Änderung; $\bar{x} \pm s$; n=3, *p<0,05 (Vergleich: ohne CD)

DPE/CD	Nettoretentionszeit [min]	Kapazitätsverhältnis	Änderung [%]
ohne CD	15,78±0,085	22,87	
α -CD	15,71±0,026	22,76	-0,46
HP- α -CD	15,67±0,034	22,70	-0,70
β -CD	14,69±0,014 *	21,29	-6,62
HP- β -CD	14,23±0,020 *	20,62	-9,44
γ -CD	15,27±0,047 *	22,12	-3,13
HP- γ -CD	15,33±0,014 *	22,22	-2,73

Nettoretentionszeit beträgt 15,78±0,085 min, das Kapazitätsverhältnis liegt bei 22,87. Die Nettoretentionszeiten und Kapazitätsverhältnisse der Versuche mit α -, β - und γ -CD und ihren Hydroxypropylderivaten sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Die Nettoretentionszeiten von DPE unter dem Einfluss von α - und HP- α -CD werden in so geringem Maße reduziert, dass sich ein signifikanter Unterschied nicht feststellen lässt. Demgegenüber zeigen sich deutliche Verminderungen der Nettoretentionszeit insbesondere für β - und HP- β -CD, aber auch für γ - und HP- γ -CD, allerdings weniger ausgeprägt. In Abbildung 5.5 sind die unterschiedlichen Nettoretentionszeiten von DPE im Vergleich zur Nettoretentionszeit ohne CD-Beeinflussung grafisch dargestellt.

Noch deutlicher werden die Ergebnisse, wenn die prozentualen Änderungen der Retentionszeiten einander gegenüber gestellt werden. Die Daten aus Tabelle 5.3 sind hierfür in Abbildung D.26 im Anhang D auf Seite 199 dargestellt.

5.3.5 Diskussion

Die gewonnenen Ergebnisse ermöglichen eindeutige Aussagen bezüglich der Wechselwirkungen von DPE mit den untersuchten Cyclodextrinen. Bei α - und HP- α -

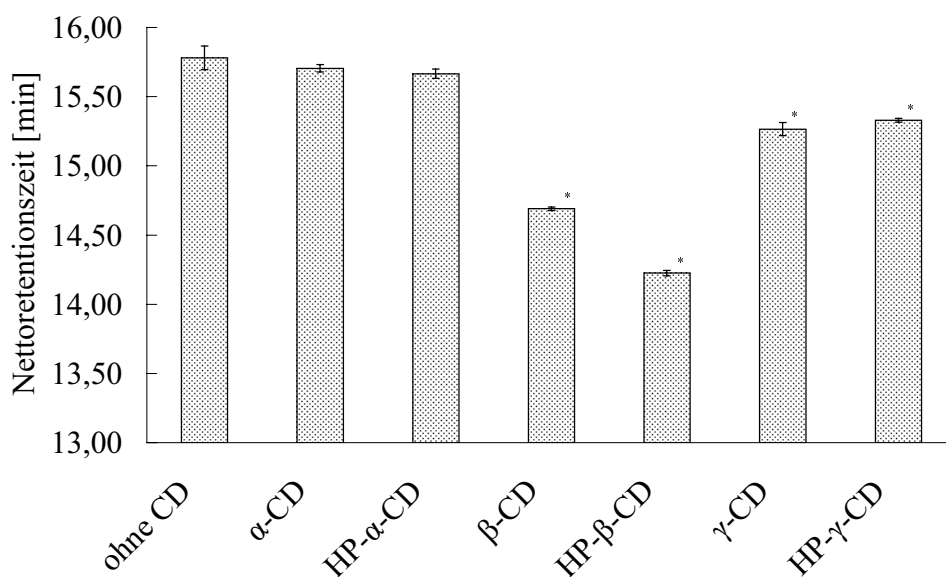


Abbildung 5.5: Nettoretentionszeiten von DPE in Abhängigkeit verschiedener Cyclodextrine in der mobilen Phase; $\bar{x} \pm s$; $n=3$; $*p<0,05$ (Vergleich: ohne CD)

CD treten keine Wechselwirkungen mit DPE auf. Dem gegenüber zeigen die anderen untersuchten Cyclodextrine eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Wechselwirkung mit DPE in der Rangfolge: HP-β-CD > β-CD > γ-CD > HP-γ-CD. Da, wie bereits oben erwähnt, andere mögliche die Retentionszeit verkürzende Faktoren ausgeschlossen werden konnten, ist ein Nachweis der Wechselwirkungen mit Hilfe der HPLC in vorliegendem Fall gegeben. Es sei jedoch angemerkt, dass in der Literatur die HPLC-Analytik zum Nachweis von CD-Wechselwirkungen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die große Anzahl mit- und gegeneinander wirkender Faktoren mag dabei einer der Hauptgründe sein.

5.4 Spektroskopische Analysenmethoden

5.4.1 Allgemeine Bemerkungen

Die spektroskopischen Analysenmethoden beruhen auf Reaktionen von Atomen und/oder Molekülen auf eine von außen einwirkende Strahlungsenergie. Durch die

Einstrahlung von Energie gehen die Moleküle und Atome in einen höheren Energiezustand über (Anregung). Der Rückgang in den Grundzustand erfolgt meist in Form von Wärmeenergie, aber auch eine Energieemission als Strahlungsenergie ist möglich. Das Ausmaß der Absorption und Emission von Energie ist von der Art der Atome, den Bindungsverhältnissen in den Molekülen und der Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes abhängig. Der Zusammenhang zwischen der Wellenlänge und der Energie der eingestrahlteten Lichtquanten wird mit der von Planck aufgestellten Gleichung (5.5) beschrieben.

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (5.5)$$

E ... Energie [J]

h ... Plancksches Wirkungsquantum [J·s]

c ... Lichtgeschwindigkeit [m·s⁻¹]

λ ... Wellenlänge [m]

5.4.2 UV-Spektroskopie

5.4.2.1 Theoretische Grundlagen

Grundlage des Verfahrens ist die Fähigkeit organischer Moleküle, Energie des ultravioletten Lichtes zu absorbieren. Dies geschieht unter Anregung vorhandener π - und n -Elektronen. Die für die Absorption verantwortlichen Teile eines Moleküls werden als Chromophore bzw. als chromophores System bezeichnet. Die möglichen Elektronen-Übergänge werden durch das Jablonski-Termschema wiedergegeben, eine Darstellung dieses Schemas findet man u. a. in [RÜCKERT et al. 1988].

Als Messgrößen der Lichtabsorption werden die Transmission T und die Absorption A angegeben, die nach Gleichung 5.6 und 5.7 berechnet werden.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (5.6)$$

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (5.7)$$

T ... Transmission

A ... Absorption

I_0 ... Intensität des eingestrahnten Lichts

I ... Intensität des nicht absorbierten Lichts

5.4.2.2 Versuchsdurchführung

Von Dipivefrin wurden in 0,1 %iger wässriger Lösung jeweils ohne und mit Zusatz von α -, HP- α -, β -, HP- β -, γ -CD und HP- γ -CD UV-Spektren (Spektralphotometer s. Anh. B) im Bereich von 210–340 nm aufgenommen. Dabei wurde in drei CD-Konzentrationen, jeweils im molaren Verhältnis CD:DPE von 1:1, 6:1 und 8:1, gemessen.

Ebenfalls wurden von allen CD in wässriger Lösung UV-Spektren mit der höchsten verwendeten Konzentration im Bereich 210–340 nm aufgenommen, um auf Eigenabsorptionen der verwendeten CD zu prüfen.

Um auszuschließen, dass nicht die Glucosestrukturen der Cyclodextrine für die vermuteten Wechselwirkungen verantwortlich sind, sondern tatsächlich die durch die Cyclodextrinstruktur bedingten Eigenschaften der Kavität (s. a. Kap. 3.2.2, S. 42), war ein Spektrum mit Glucosezusatz im molaren Verhältnis Glucose:DPE von 8:1 aufzunehmen. Eine in dieser Konzentration hergestellte reine Glucoselösung diente als Test auf Eigenabsorptionen der Glucose im Messbereich.

5.4.2.3 Ergebnisse

Durch keines der der DPE-Lösung zugesetzten Cyclodextrine war eine Wellenlängen-Verschiebung (Peak-Shift) für DPE an den beiden gemessenen Maxima

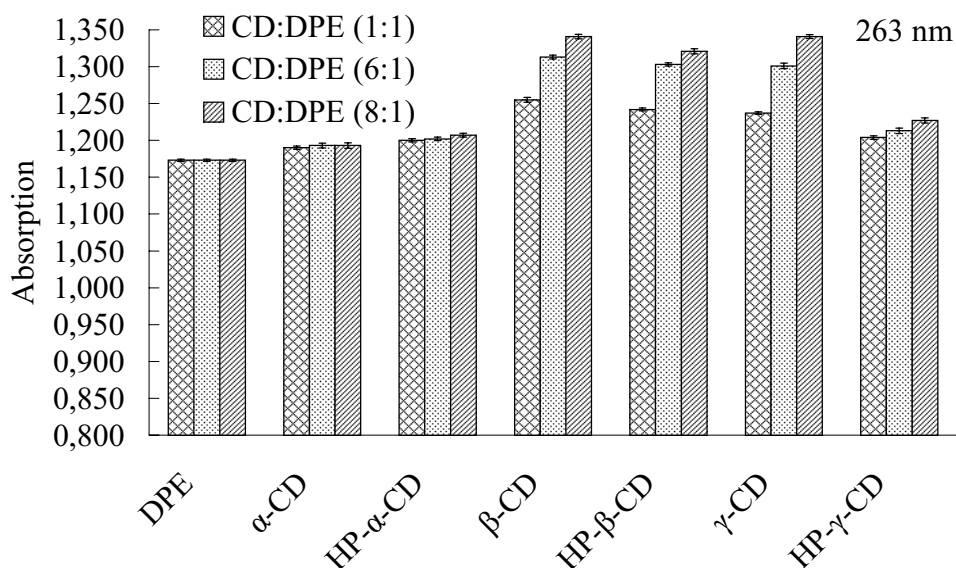


Abbildung 5.6: Veränderung der UV-Absorption bei 263 nm von Dipivefrin durch die einer wässrigen Lösung zugesetzten unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Cyclodextrine

(263 nm, 269 nm) zu finden. Hingegen waren teilweise signifikante Veränderungen in der Absorption messbar. In den Abbildungen 5.6 und 5.7 sind die Ergebnisse der Absorptionsmessungen für die UV-Peaks von DPE bei 263 nm und 269 nm in Abhängigkeit vom zugesetzten CD und dessen Konzentration dargestellt.

Die Ergebnisse fallen für die verschiedenen CD unterschiedlich aus. Für DPE ist unter dem Einfluss von α - und HP- α -CD bei 263 nm nur ein äußerst geringer Anstieg der Absorption zu verzeichnen; eine Veränderung der Absorption bei 269 nm findet hingegen nicht statt. Im Gegensatz dazu steigen die gemessenen Absorptionen unter dem Einfluss von β -, HP- β - und γ -CD signifikant bei beiden Wellenlängen bereits ab einem CD:DPE-Verhältnis von 1:1 an. Signifikant ist auch der von der CD-Konzentration abhängige weitere Anstieg der Absorptionen sowohl bei 263 nm als auch bei 269 nm. Bei HP- γ -CD fällt der konzentrationsabhängige Anstieg der Absorption deutlich geringer aus, als bei nativem γ -CD. Während bei 263 nm in den Konzentrationen ab dem molaren Verhältnis CD:DPE 6:1 ein Anstieg verzeichnet werden kann, ist bei einer Wellenlänge von 269 nm im molaren Verhältnis CD:DPE bis 6:1 keine eindeutige Erhöhung der Absorption zu verzeichnen. Dies erfolgt erst ab dem molaren Verhältnis von 8:1.

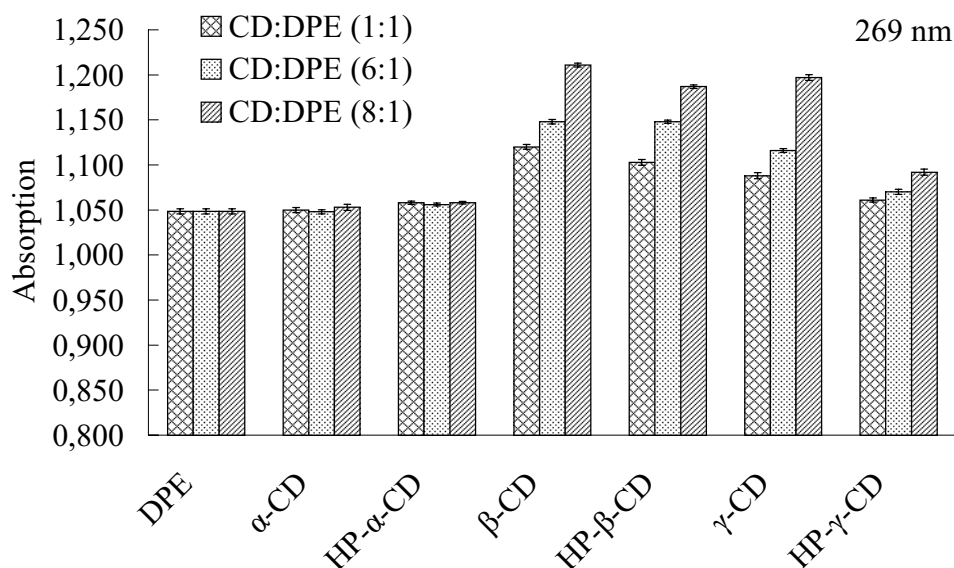


Abbildung 5.7: Veränderung der UV-Absorption bei 269 nm von Dipivefrin durch die einer wässrigen Lösung zugesetzten unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Cyclodextrine

Deutlicher werden die Unterschiede, wenn, wie in Kapitel 4.5.4, die erhaltenen Messwerte normiert dargestellt werden. Für die vorliegende Untersuchung bietet sich an, die Absorptionen des DPE ohne den Einfluss der Cyclodextrine bei den Wellenlängen 263 nm ($A=1,173$; $A_{1cm}^{1\%} = 11,73$; $A_{1cm}^{1mol} = 455$) und 269 nm ($A=1,048$; $A_{1cm}^{1\%} = 10,49$; $A_{1cm}^{1mol} = 407$) als 100%-Wert anzusetzen. Die normierten Werte sind in den Tabellen 5.4 und 5.5 zusammengestellt.

Tabelle 5.4: Zusammenstellung der normierten UV-Absorptionszunahme (gegenüber der Absorption in CD-freier Lösung) von DPE bei 263 nm als Funktion der unterschiedlichen Molverhältnisse CD:DPE, * $p < 0,05$ (Vergleich: ohne CD)

Molverhältnis CD:DPE	normierte UV-Absorptionsänderung [%]					
	α-CD	HP-α-CD	β-CD	HP-β-CD	γ-CD	HP-γ-CD
1:1	1,45	2,30	6,99 *	5,88 *	5,46 *	2,64
6:1	1,71	2,47	11,94 *	11,08 *	10,91 *	3,41 *
8:1	1,71	2,90	14,32 *	12,62 *	14,32 *	4,60 *

Tabelle 5.5: Zusammenstellung der normierten UV-Absorptionszunahme (gegenüber der Absorption in CD-freier Lösung) von DPE bei 269 nm als Funktion der unterschiedlichen Molverhältnisse CD:DPE, * $p < 0,05$ (Vergleich: ohne CD)

Molverhältnis CD:DPE	normierte UV-Absorptionsänderung [%]					
	α -CD	HP- α -CD	β -CD	HP- β -CD	γ -CD	HP- γ -CD
1:1	0,19	0,95	6,87 *	5,25 *	3,82 *	1,24
6:1	0,00	0,76	9,54 *	9,54 *	6,49 *	2,10
8:1	0,48	0,95	15,55 *	13,26 *	14,22 *	4,20 *

Eine graphische Darstellung der normierten Ergebnisse (Abb. D.24, D.25) findet sich im Anhang D ab Seite 198. Für 263 nm liegt die Steigerung der Absorption durch den Einfluss α - bzw. HP- α -CD deutlich unter 3 %. Bei 269 nm kann bei einer Änderung von < 1 % nicht von einer Steigerung geredet werden. Im Vergleich dazu ergeben sich Absorptionszunahmen von 12,62–15,55 % (für beide Wellenlängen) für β -, HP- β und γ -CD, mit der höchsten CD-Konzentration. Für HP- γ -CD resultierten dagegen in den molaren CD:DPE-Verhältnisse von 6:1 und 8:1 lediglich Steigerungen der UV-Absorption des DPE von 3,41–4,60 % bzw. 2,10–4,20 %. Weder die verwendeten Cyclodextrine noch die Glucose zeigten im UV-Bereich 240–340 nm eine Eigenabsorption. Die Lage der Peaks bei 263 nm und 269 nm von DPE und deren gemessene Absorptionen erfuhren durch die Zugabe von Glucose keine messbare Veränderung.

5.4.2.4 Diskussion

Dipivefrin zeigt mit einigen der untersuchten CD, insbesondere mit β -, HP- β - und γ -CD, Wechselwirkungen, die sich in einer Zunahme der UV-Absorption an den Wellenlängen 263 nm und 269 nm widerspiegeln. Ein häufig bei Wechselwirkungen auftretender Peak-Shift ist jedoch nicht zu beobachten. Daher sind die Ergebnisse für eine alleinige Feststellung von Wechselwirkungen nur mit Einschränkungen geeignet. Die Stärke der Absorption ist konzentrationsabhängig von der eingesetzten Cyclodextrinmenge. Für HP- γ -CD deuten die Ergebnisse auf eine geringfügige Wechselwirkung mit DPE hin. Als Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen muss eine Wechselwirkung für α -CD und sein hydroxypropyliertes

Derivat verneint werden. Der Verdacht auf eine äußerst geringen Wechselwirkung mit DPE durch eine graduelle Erhöhung der Absorption bei 263 nm muss durch das Fehlen eines signifikanten Anstiegs bei 269 nm zurückgewiesen werden.

Die nachgewiesenen Wechselwirkungen können auf Grund des erstellten Vergleichsspektrums von DPE in Glucoselösung eher der Struktureigenschaft der Kavität zugeordnet werden. Das Fehlen einer nachweisbaren Wechselwirkung von DPE mit Glucose im UV-Spektrum (fehlender Peak-Shift und fehlende Veränderung der Absorption) bestätigt diese Annahme. Die durch die Substitution hervorgerufenen Änderungen der Absorption gegenüber den nativen CD sind lediglich zwischen γ und HP- γ -CD signifikant. Eine generelle Aussage darüber, dass die Hydroxypropylierung Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen DPE und CD nimmt, lässt sich nicht treffen.

5.4.3 ^1H -NMR-Spektroskopie

Mit der NMR-Spektroskopie (NMR=nuclear magnetic resonance, magnetische Kernspinresonanz) wird die resonante Anregung von Übergängen zwischen unterschiedlichen Zuständen von Kernspins untersucht. Grundlage für die magnetische Resonanz ist die Existenz des Spins, eines quantisierten internen Drehimpulses in Elementarteilchen. Erste Hinweise auf dessen Existenz Anfang des 20. Jahrhunderts gab es durch die nicht mit den gängigen Theorien erklärbaren Aufspaltungen von atomaren Spektrallinien. Die erste Bestimmung von magnetischen Momenten in einem Atomstrahl gelang 1938 [RABI et al. 1938], der Nachweis in kondensierter Materie, dem heutigen Hauptanwendungsbereich, erfolgte 1946 [PURCELL et al. 1946, BLOCH et al. 1946].

5.4.3.1 Theoretische Grundlagen

Die meisten Elementarteilchen, auch viele Kerne, besitzen eine Spin, einen quantisierten internen Drehimpuls. Durch den magnetischen Moment der Drehimpulse ist eine Ankopplung an externe Magnetfelder (Zeeman-Effekt) möglich. Spinzustände, die ohne ein Magnetfeld entartet sind, weisen in einem Magnetfeld unterschiedliche Energien auf. Im einfachsten Fall (Protonenresonanz, zwei

Energiezustände im magnetischen Feld: $m = -\frac{1}{2}$ und $m = +\frac{1}{2}$, m = magnetische Quantenzahl) sind die Energiedifferenzen proportional der Magnetfeldstärke H_0 , wobei eine teilchenabhängige Proportionalitätskonstante γ (gyromagnetisches Verhältnis) existiert (Gl.5.8).

$$\Delta E = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot H_0 \quad (5.8)$$

Die NMR-Spektroskopie misst diese Energiedifferenzen an Kernen, im Fall der ^1H -NMR an Protonen, indem ein magnetisches Wechselfeld eingestrahlt wird. Erfüllt dessen Frequenz die Resonanzbedingung $E = h\nu$, werden die Übergänge zwischen den Spinzuständen induziert, d. h. die Protonen können dem Feld Energie entziehen und in den energiereicheren Spinzustand übergehen. Die Absorption erreicht im System ein Maximum, wenn diese Resonanzbedingungen erfüllt sind.

Ein Spin führt in einem Magnetfeld eine Präzessionsbewegung durch. Die Kreisfrequenz ω der Präzessionsbewegung steigt proportional der Stärke H_0 des Magnetfeldes an. Die Larmor-Gleichung (Gl. 5.9) gibt diesen Zusammenhang wieder.

$$\omega = 2\pi\nu = \gamma H_0 \quad (5.9)$$

Die präzedierende Magnetisierung erzeugt in einer Aufnahmespule eine Spannung (Faraday-Effekt), die mit der Larmorfrequenz ω oszilliert und als sogenannte freie Induktion gemessen wird.

Das äußere Magnetfeld wird durch Felder benachbarter Kerne und durch die Induktionswirkung der Elektronen abgeschwächt. Durch die Feldabschwächung kommt es zu einer Verschiebung der Resonanzlinien der Atome im Vergleich zu isolierten Kernen. Da der chemische Bindungszustand eines Atoms die Lage zu den anderen Atomkernen und die Elektronenverteilung bestimmt, bezeichnet man die daraus resultierende Verschiebung der Resonanzlinien als chemische Verschiebung δ (chemical shift). Die Stärke der Verschiebung wird als relativer Wert in ppm angegeben und beschreibt damit die relative Verschiebung des Signals gegenüber einem Standard. Als Vergleichssubstanz findet meist Tetramethylsilan

((CH₃)₄Si, TMS), eine Substanz mit zwölf magnetisch äquivalenten Wasserstoffatomen, Verwendung. Der Kernresonanz wird hierbei eine chemische Verschiebung von $\delta = 0$ zugeordnet. Die relative Angabe bezüglich des Standards erlaubt einen Austausch und Vergleich von Messdaten, die auf verschiedenen ¹H-NMR-Spektrometern mit unterschiedlichen Feldstärken und Wechselfeldfrequenzen ermittelt wurden.

Bei Wasserstoffkernen, die räumlich eng benachbart sind, kann die Relaxation des einen Kerns durch Wechselwirkung mit dem anderen stattfinden. Bei Einstrahlung in der Resonanzfrequenz kann Energie von einem auf den anderen Kern übertragen werden, was zu einem Anstieg der relativen Intensität führt. Dieser Vorgang wird als Nuklear-Overhauser-Effekt (NOE) bezeichnet und kann über die Messung der Intensitätsteigerung zur Abstandsmessung von Protonen benutzt werden.

Die Abstände zwischen den einzelnen Maxima eines durch Spin-Kopplung aufgespaltenen Signals werden als Kopplungskonstante j bezeichnet. Änderungen der Kopplungskonstanten treten immer dann auf, wenn die Wechselwirkungen von benachbarten, skalar verknüpften Atomen durch Konformationsänderungen beeinflusst werden.

NMR-Spektren liefern letztlich drei unterschiedliche Informationen:

- die chemische Verschiebung,
- die Signalintensität,
- und die Kopplungskonstanten.

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, Interaktionen zwischen den im Inneren der CD-Kavität befindlichen Wasserstoffatomen und geeigneten Strukturen des Dipivefrins nachzuweisen. Schwierigkeiten bei der Untersuchung bereiteten die Überlagerung der Signale mit den Wasserstoffatomen an der Außenseite der CD, Unreinheiten der CD, insbesondere bei den hydroxypropylierten CD, die nicht als chemisch einheitliche Substanzen vorliegen, und Einflüsse des verwendeten Lösungsmittels.

D₂O als Lösungsmittel für das ausgewählte HP- β -CD und DPE käme der Zielsetzung, Wechselwirkungen direkt in der wässrigen Lösung zu beobachten, am nächsten. Substituierte Cyclodextrine sind keine chemisch einheitlichen Substanzen und werden mit einem durchschnittlichen Substitutionsgrad gekennzeichnet. Das führt dazu, dass die Protonen der Substituenten ein diffuses Signal mit verbreiterten Linien ergeben. Eine Zuordnung der passenden Signale zu den Protonen im Inneren der Kavität wird dadurch erschwert oder unmöglich gemacht [FRANKE 1998]. Desweiteren werden durch den sogenannten D₂O-Austausch die Protonen der OH-Gruppen der CD und der NH-Gruppe im DPE gegen Deuterium ausgetauscht. Die NMR-Spektroskopie liefert für Deuterium kein Signal. Sollten diese Gruppierungen, wie die obigen Vermutungen nahe legen, tatsächlich an den Wechselwirkungen beteiligt sein, wären sie in D₂O somit maskiert und einer Untersuchung nicht zugänglich [MÜGGE 2001].

Dimethylsulfoxid (DMSO) kommt als in der NMR häufig verwendetes aprotisches Lösungsmittel der Bildung von CD/DPE-Komplexen nicht entgegen; sehr niedrige Konzentrationen des sich bildenden „Komplexes“ sind die Folge. Eine sichere Aussage darüber, ob gefundene Wechselwirkungen in wässriger Lösung existent und stabil sind und die Kavität im Sinne einer Einschlussverbindung an der Komplexbildung beteiligt ist, ist an Hand der Untersuchung in DMSO nicht abschließend möglich.

5.4.3.2 Versuchsdurchführung

Zum Nachweis von CD/DPE-Komplexen mittels ¹H-NMR-Spektren wurde exemplarisch HP- β -CD ausgewählt. Es wurden HP- β -CD, DPE sowie eine 1:1 Mischung von HP- β -CD und DPE jeweils in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und 30 min geschüttelt. Von den Lösungen wurden NOESY-Spektren mit 600 MHz bei 300 K aufgenommen. Die Versuche wurden als Auftrag von der Arbeitsgruppe NMR des Fachbereich Chemie der Humboldt-Universität durchgeführt und ausgewertet.

5.4.3.3 Ergebnisse und Diskussion

Die NOESY-Spektren belegen eine eindeutige Wechselwirkung von DPE mit HP- β -CD. Durch die verbreiterten Linien der Signale (s. o.) war eine eindeutige Zuordnung auf die im Inneren der Kavität befindlichen Protonen H-3' und H-5' nicht möglich. Für DPE fiel auf, dass das Signal der protonierten sekundären Amino-Gruppe bei 8,7 ppm durch HP- β -CD fast völlig verschwand. Wenn die NH-Gruppe am Wechselwirkungsgeschehen teilnimmt, ist eine Reaktion nur mit den polaren Strukturen (z. B. den OH-Gruppen) der Außenseite der CD möglich und widerspricht der Annahme einer Einschlussverbindung. Ein Nachweis, ob und welche Protonen des CD an einer Einschlussverbindung beteiligt sind, war auf Grund der diffusen Signale nicht möglich. Eine genaue Stöchiometrie für den Komplex konnte aus den vorliegenden Daten nicht ermittelt werden. Eine Schlussfolgerung, ob die Wechselwirkungen in wässriger Lösung (D_2O) nachweisbar sind und die Kavität daran Anteil hat, ist nicht möglich. Ebenso wäre eine Wechselwirkung zwischen der NH- und der OH-Gruppe (s. o.) im Sinne einer Wasserstoffbrückenbindung in D_2O nicht nachweisbar.

Kapitel 6

Wechselwirkungen mit dem cornealen Gewebe

6.1 Zielstellung

Mit Hilfe der Differenzthermoanalyse bzw. der Elektronenmikroskopie waren mögliche Wechselwirkungen zwischen cornealem Gewebe und DPE bzw. DPE/CD zu untersuchen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass sich durch stattfindenden Wechselwirkungen mit DPE, sowie mit den CD, sowohl die thermischen Eigenschaften als auch die mikroskopisch erkennbaren Strukturen der am Aufbau der Cornea beteiligten Gewebe verändern. Untersucht wurden sowohl der Einfluss von DPE auf die Cornea, als auch der von α -CD bzw. β -CD. Desweiteren kamen α - und β -CD in Kombination mit DPE zur Anwendung. Dabei konzentrierten sich die Untersuchungen auf einen qualitativen Nachweis der Wechselwirkungen.

6.2 Thermoanalytik

6.2.1 Allgemeine Bemerkungen

Die Methoden der thermischen Analyse erfassen physikalische Parameter, die Aussagen über chemische und physikalische Vorgänge in einem System liefern.

Untersucht werden der Einfluss der Temperatur auf die Zustandsänderung eines Systems, Phasenumwandlungen, chemische Zersetzungen, Sorptionsvermögen und thermische Ausdehnungen. Le Chatelier untersuchte 1887 die Aufheizung von Tonerden im elektrischen Ofen mit einer Messanordnung aus Thermoelement, Spiegelgalvanometer und Fotoplatte. Durch die Auswertung von Abkühlungskurven kam Tammann zu einer wesentlichen Verfeinerung des Verfahrens. Robert Austentat machte 1899 den entscheidenden Schritt zur Differenzthermoanalyse durch die Einführung eines Neutralkörpers und die Messung der Temperaturdifferenz zwischen diesem und der Probe. Durch zwei gegeneinander geschaltete Thermoelemente kam es zu einer wesentlichen Empfindlichkeitssteigerung.

6.2.2 Theoretische Grundlagen

Die verschiedenen Methoden der thermischen Analyse, die Thermogravimetrie, die Differenzthermoanalyse, die dynamische Differenzkalorimetrie und die Dilatometrie, haben sich in wissenschaftlichen Untersuchungen etabliert und bewährt. Aufgrund der Spezifik der Methoden lässt sich die Messtechnik nicht ohne weiteres zur qualitativen und direkten quantitativen Bestimmung der Zusammensetzung einer Probe verwenden. Einen großen Einfluss haben gerätetechnische Besonderheiten. Der Wärmeaustausch zwischen Ofen und Probe, unterschiedliche Sensoren der Geräte verschiedener Hersteller und die unterschiedlichen Eigenschaften des Probenmaterials könne die Aussagen des Gerätes beeinflussen. Festlegungen zur Thermoanalyse bieten die DIN-Normen DIN 51005 „Thermoanalyse“ [DIN 1983] und DIN 51007 „Differenzthermoanalyse“ [DIN 1994]. Aus der DIN 51007 1. „Anwendungsbereich und Zweck“:

„Die Festlegungen aus dieser Norm gelten für die Differenzthermoanalyse (DTA) an festen und flüssigen Stoffen. Mit der Differenzthermoanalyse können alle physikalischen und chemischen Vorgänge erfasst werden, die mit einem Wärmeeffekt verbunden sind. Dabei werden sowohl charakteristische Temperaturen als auch kalorische Informationen erhalten. Demnach können mit Hilfe der DTA zum Beispiel Umwandlungstemperaturen, Umwandlungswärmen, Reaktionstemperaturbereiche, Reaktionswärmen, Reinheit eutektischer Systeme und

spezifische Wärmekapazitäten bestimmt werden. Weitere Erkenntnisse können durch Messungen in verschiedenen Atmosphären (Gasart und Druck) und unter eigenem Dampfdruck erhalten werden. Mit der DTA können Messungen zur Bestimmung der Reaktionskinetik durchgeführt werden. Bei simultanen Verfahren werden Signale weiterer Kenngrößen als Funktion der Temperatur oder der Zeit gemessen. Beispielsweise werden bei simultanen DTA/TG-Messungen zusätzlich zur DTA Massenänderungen als Funktion der Temperatur oder der Zeit ermittelt.“

Die Untersuchungen der DTA erfolgen temperaturdynamisch. Unter temperaturdynamischen Bedingungen treten keine stationären Verhältnisse bzw. thermodynamische Gleichgewichte ein. Es kommt daher zur Beeinflussung der Messergebnisse durch die festgelegten Versuchsbedingungen. Durch die endliche Abmessung, die Wärmeleitfähigkeit und die Wärmekapazität der Probe und ihrer Halterung sind Temperaturgradienten und bei chemischen Umsetzungen Konzentrationsgradienten in der Probe unvermeidbar. Mit steigender Heizrate, steigender Einwaage und abnehmender Wärmeleitfähigkeit der Probe erhöhen sich die Differenzen immer weiter. Diese Effekte können sich überlagern. Die durch die Clausius-Clapeyron'sche Gleichung (Gl. 6.1) beschriebene Druckabhängigkeit von Gleichgewichtstemperaturen spielt auch unter den dynamischen Bedingungen der Thermoanalyse eine wesentliche Rolle.

$$\frac{dp}{dT} = \frac{\Delta H}{T \cdot \Delta V} \quad (6.1)$$

p ... Gleichgewichtsdruck

T ... absolute Temperatur

ΔH ... Reaktionsenthalpie

ΔV ... molare Volumenänderung

Durch die hohen Temperaturen können chemische Reaktionen mit der Atmosphäre eintreten. Häufigste Reaktion ist die Oxidation durch den Luftsauerstoff.

Deshalb wird die Ofenatmosphäre häufig durch Druck-, Spül- und Schutzgasstrom kontrolliert, um ein konstantes Milieu im thermodynamischen Sinne aufrecht zu erhalten. Behinderte Diffusion und gasförmige Produkte können die über der Probe herrschende Atmosphäre verändern. Dadurch kommt es zu erheblichen Abweichungen von den allgemeinen atmosphärischen Bedingungen. Die Verbesserungen der Untersuchungsergebnisse durch eine geringere Abmessung der Probe und eine geringere Heizrate sind begrenzt. Geringe Heizraten sind zeitintensiv und daher unökonomisch; sehr kleine Proben repräsentieren bei heterogenem Material nicht den Gesamtzustand des Systems. Die vorherige Verarbeitung von Substanzen wirkt sich charakteristisch auf das thermodynamisch erfassbare Verhalten aus. Tempern, Abschrecken, Zerkleinern, Verformen, Bestrahlen und Lagern haben einen deutlichen Einfluss. Bei biologischen Proben ist auf eine einheitliche Probennahme, Verarbeitung, Inkubation und Trocknung Wert zu legen.

Voraussetzungen für die Tian-Calvet-Anordnung im verwendeten Gerät (STA 409 C, Fa. Netzsch) sind eine hohe Symmetrie der Probenhalterung, reproduzierbare Position der Probentiegel und ein definierter geringer Wärmewiderstand zwischen Probe und Thermoelement. Die Ermittlung der Enthalpiedifferenz ΔH in dieser Anordnung zu den gemessenen ΔT -Werten lässt sich auf Fehler in der Größenordnung von 5 % senken. Die Wärmekapazität von Halterungen und Messfühlern muss deutlich größer sein als die der Proben, um den Einfluss der Änderung der Probeneigenschaften auf die Gestaltung des Signals zu reduzieren. Auf Grund der hohen Wärmekapazität des Messsystems (Halterungen, Sensoren, Tiegel) ist ein leerer Tiegel ohne Inertsubstanz auf der Referenzseite möglich.

Bei konstanter Aufheizgeschwindigkeit ergibt sich eine linear ansteigende Temperatur-Zeit-Kurve. Für qualitative Vergleichsuntersuchungen haben sich Heizraten von 10–20 K·min⁻¹ als sinnvoll erwiesen; quantitative Untersuchungen benötigen Heizraten von 0,5–4 K·min⁻¹.

6.2.3 Beeinflussende Faktoren

Die folgenden Faktoren können die Ergebnisse von thermoanalytischen Untersuchungen beeinflussen.

1. Probennahme bzw. Probenvor- und -aufbereitung (Korngröße der Probe, Packungsdichte, Probeneinwaage)
2. Auswahl des Tiegels (Tiegelmaterial, -form, -größe)
3. Auswahl der Heizelemente (Material, spezifischer Widerstand) und Thermoelemente (Material, Thermospannung)
4. Auswahl der Inertsubstanz (Ähnlichkeit mit Probenmaterial in den thermischen Eigenschaften)
5. Aufheizgeschwindigkeit (Die Heizrate wird durch die Reaktionsgeschwindigkeit und den Wärmewiderstand der Probe bestimmt und soll in bestimmten Grenzen liegen. Es soll gewährleistet werden, dass die Temperatur am Rand und im Inneren der Probe annähernd gleich groß ist.)
6. Anordnung der Thermoelemente (Die konstruktive Anordnung der Heiz- und Thermoelemente beeinflusst die Empfindlichkeit und das Auflösungsvermögen des Analysensystems.)
7. Wärmekapazität des Systems (Die Wärmeleitung zwischen Probe und Inertsubstanz sorgt für die Gewährleistung eines schnellen Temperatúrausgleichs. Je langsamer der Temperatúrausgleich stattfindet, desto größer wird die Temperaturdifferenz.)
8. Ofenatmosphäre (Die Art der Atmosphäre (Umgebungsluft, Inertgas, Reaktionsgas, Unter- bzw. Überdruck), welche die Probe umgibt, hat wesentlichen Einfluss auf das Reaktionsverhalten der Probe. Soll eine Reaktion mit Sauerstoff oder Stickstoff ausgeschlossen werden, ist es sinnvoll, ein Gerät mit gasdichter Messzelle zu verwenden und einen Spülgasstrom oder ein Vakuum zu erzeugen.)

Das entscheidende Kriterium für eine zuverlässige und reproduzierbare Analyse ist daher die exakte Einhaltung aller angegebenen Kriterien.

6.2.4 Probennahme und Probenvorbereitung

Die DIN-Vorschrift 51007 [DIN 1994] fordert: „Die Probennahme ist materialgerecht und probenspezifisch durchzuführen. ... Vor dem Messen muss die Probe in geeigneter Atmosphäre, ggf. in einem Normklima, nach DIN 50014 bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes aufbewahrt werden.“

Von den Rinderaugen wurden die Corneae abgetrennt und auf eine einheitliche Größe geschnitten. Die Corneae wurden einzeln mit 10 ml Pufferlösung pH 7,4 unter ständiger Bewegung der Lösung bei 33 °C über einen Zeitraum 90 min inkubiert. Neben der Verwendung der reinen Pufferlösung waren DPE (2,58 mmol·l⁻¹) bzw. DPE und α/β -CD (10,32 mmol·l⁻¹) zugesetzt. Danach wurden die Corneae kurz mit Wasser abgespült und im Exsiccator über Kieselgel bis zur Massekonstanz getrocknet. Von diesen Proben wurden exemplarisch die in Kap. 6.3 beschriebenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen angefertigt.

Um interindividuelle Unterschiede auszuschließen, wurden die Parallelmessungen jeweils mit Stücken derselben Cornea durchgeführt. Hierzu wurde die Cornea radial in vier Teile zerlegt. Ein Viertel wurde 90 min in Puffer pH 7,4 inkubiert und getrocknet. Die verbliebenen drei Teilstücke wurden mit den DPE-CD-Lösungen in den oben genannten Konzentrationen inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Teilstück sofort getrocknet. Je ein weiteres Teilstück wurde 90 min in Puffer bzw. 180 min (bei einmaligem Wechsel des Lösungsmittels) in Puffer nachinkubiert und getrocknet.

Darüber hinaus, um den Einfluss des „Waschprozesses“ der langen Inkubationszeiten mit reinem Lösungsmittel zu simulieren, wurden gedrittelte Corneae für 90, 180 und 270 min in Puffer bei 33 °C inkubiert und getrocknet.

6.2.5 DTA/TG-Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden auf einem DTA/TG-Gerät der Fa. Netzsch (STA 409 C) durchgeführt. Um Vergleiche mit organischem Gewebe durchführen und die verwendeten Arznei- und Hilfsstoffe in den Proben identifizieren zu können, war es notwendig, die bei der Untersuchung benutzten Reinsubstanzen thermoanalytisch

zu charakterisieren. Im Bereich von 25 °C bis 800 °C bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 10,0 K·min⁻¹ wurden DTA/TG-Kurven von Dipivefrin, Epinephrin, Pivalylsäure, dem Trockenrückstand des verwendeten Puffers und von α - und β -Cyclodextrin aufgenommen (Atmosphäre: Luft; Tiegel: Pt).

Für die Corneaprobe galten folgende Parameter: Atmosphäre: Luft; Temperaturbereich von 25 °C bis 800 °C, Heizrate: 10,0 K·min⁻¹, Tiegel: Pt-Rh.

Laut DIN 51007 [DIN 1994] fanden die durchgeführten Arbeiten im Mitteltemperaturbereich (Raumtemperatur bis 1000 °C) statt.

6.2.6 Auswertung

Mit der DTA-Analytik sind Vorgänge messbar, die mit kalorischen Effekten in der zu untersuchenden Probe in endlicher Zeit einhergehen. Der erste Aspekt bei der Auswertung von DTA-Analysen ist die rein phänomenologische Kurvenbetrachtung im direkten Vergleich. Weitere Aspekte der Auswertung sind die Bestimmung der Effekttemperatur aus der Abszisse (thermometrisch), das Ausmessen der Peakflächen zur Bestimmung von Enthalpiedifferenzen (kalorimetrisch) bzw. das Ausmessen von Teilflächen eines Peaks zur Bestimmung der Reinheit der Substanz und der Reaktionsgeschwindigkeit (kryometrisch bzw. kinetisch).

Aus der gewählten Aufheizgeschwindigkeit (10,0 K·min⁻¹) geht hervor, dass es die Zielsetzung der DTA/TG war, qualitative Effekte zu messen. Daher kommen bei der Auswertung nur die beiden erstgenannten Betrachtungen (phänomenologische Auswertung und Effekttemperaturen) zum Zuge. Die Erfassung von kalorischen und kinetischen Parametern ist durch die Schwankungsbreite der Zusammensetzung biologischer Organmaterialien nahezu unmöglich. Bei den dafür notwendigen geringen Aufheizzeiten von 0,5–4 K·min⁻¹ wären Versuche über das vorliegende Temperaturintervall hinaus nur in Ausnahmefällen vertretbar.

Die DTA/TG von DPE (s. Abb. D.27, S. 200) zeigt den Schmelzpeak im Bereich 170–200 °C ($t_{on}=170$ °C) und liegt damit ≈ 20 ° über den Literaturangaben [BRITTAIN 1993]. Ein direkter Vergleich und eine Abklärung der Differenz zwischen der eigenen Messung und der Literatur ist wegen der fehlenden Angaben der Messparameter in der Literatur nicht möglich. Im Bereich 240–290 °C

($t_{on}=240^{\circ}\text{C}$) findet die Abspaltung der Pivalylsäure statt, die auf Grund ihres Siedepunktes von $\approx 164^{\circ}\text{C}$ nach Abspaltung verdampft. Der gleichzeitig feststellbare thermogravimetrischen Verlust von $\approx 40\%$ entspricht annähernd dem Masseanteil der Pivalylsäure im DPE.

In keiner inkubierten Probe konnte der Schmelzpeak von DPE gefunden werden. Der auch in den Proben auftretende thermogravimetrische Verlust kann auf Grund der fehlenden endothermen Reaktion nicht mehr dem Verdampfen der Pivalylsäure zugeordnet werden. Die fehlenden Zuordnungsmöglichkeiten treffen auch für α - und β -CD zu. Vermutlich ist die Konzentration der in die Gewebe penetrierten Substanzen zu niedrig, um im Summensignal des biologischen Gewebes eindeutig erkennbar zu sein.

Die thermoanalytischen Kurven der inkubierten Gesamt-Cornea zeigten deutlich sichtbare Differenzen in ihrem Verlauf und in den Effektemperaturen. Diese Ergebnisse gelten sowohl für die Vergleichsproben als auch für die mit DPE/CD inkubierten Proben. Das kann einerseits auf interindividuelle Unterschiede der Gewebe und andererseits auf Wechselwirkungen des Arzneistoffes und der Hilfsstoffe mit dem cornealen Gewebe hindeuten. Die behandelten Corneae zeigten zwar typische Änderungen der Kurvenverläufe, eine genaue Beschreibung nach Lage der Peaks, den Effektemperaturen und der Intensität war auf Grund der individuellen Unterschiede nicht möglich.

Im Vorfeld der Untersuchungen mit Proben dergleichen Cornea zeigten die Versuche über die Simulation des „Waschprozesses“, dass unterschiedliche Inkubationszeiten in Puffer auf die thermoanalytischen Ergebnisse selbst keinen Einfluss haben.

Bessere Resultate versprochen daher die Versuche mit den unterschiedlich behandelten Proben derselben Cornea. Individuelle Unterschiede wie in den vorherigen Versuchen sollten so nicht zum Tragen kommen. Die Untersuchungen mit den wirkstoffbeladenen Corneaestücken zeigen in Abhängigkeit vom zugesetzten Cyclodextrin und der nachfolgenden Behandlung ein unterschiedliches Ergebnis.

Ein Vergleich der Kurven des in Puffer inkubierten Teilstücks der Cornea (als Vergleichswert) mit den mit DPE/ β -CD behandelten Anteilen zeigt ein deutlich verändertes Thermogramm (sowohl der DTA als auch der TG), was eine Wech-

selwirkung von DPE/ β -CD mit dem Gewebe anzeigt (s. Abb. D.28, S. 201). Es kam zu einer Peakverschiebung durch die 90-minütige Inkubation in Puffer. Nach 180 min Inkubation in Puffer wurde ein Thermogramm erhalten, dass mit dem Thermogramm des Leerwertes vergleichbare Kurvenverläufe von DTA und TG erkennen lässt (s. Abb. D.29, S. 202). Es ist daher davon auszugehen, dass die Wechselwirkungen von DPE/ β -CD mit dem Gewebe reversibel sind.

Im Gegensatz dazu führte eine Nachbehandlung mit Puffer nach der Inkubation von Corneae mit DPE/ α -CD nicht zu demselben Ergebnis. Abbildung D.30 Seite 203 zeigt die Kurvenverschiebungen zwischen Vergleichsprobe und der in DPE/ α -CD inkubierten Probe. Durch die Nachbehandlung in Puffer kam es wie DPE/ β -CD zu Peakverschiebungen nach 90 min. Im Gegensatz zum β -CD-Versuch war bei mit DPE/ α -CD behandelten Corneae nach 180 min keine Wiederherstellung der Ausgangslage zu verzeichnen (s. Abb. D.31, S. 204). Möglicherweise wäre ein längerer Prozess der Inkubation mit Puffer geeignet, die Gewebsveränderungen rückgängig zu machen. Die mit zunehmender Inkubationsdauer fortschreitende Quellung der Gewebe und die daraus u. a. resultierenden Probleme für einen einheitlichen Trocknungsprozess stehen diesbezüglichen Untersuchungen entgegen. Es ist zu allerdings vermuten, dass die bekannten irritierenden Wirkungen von hohen Dosen α -CD (s. 3.2.2.3) auch in niedrigsten Dosierungen irreversible Veränderungen hervorrufen, die zwar in vivo unerheblich sind, in vitro aber durch die fehlende Eigenregeneration des Gewebes nachweisbar bleiben. Eine längerdauernde Inkubation in Puffer würde in dem Fall nicht zu einem Ergebnis führen, das den Messungen der Vergleichsprobe entspricht.

6.3 Elektronenmikroskopie

6.3.1 Allgemeine Bemerkungen

Mitte der Zwanziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurden die entscheidenden Entdeckungen gemacht, um die Grenzen der Lichtmikroskopie bei der Untersuchung kleinster Objekte zu überwinden. Die Wellenlänge des Lichtes begrenzt die erreichbare Vergrößerung auf das ca. 1500fache, das entspricht einer Auflösungs-

grenze von $\approx 0,2 \mu\text{m}$. Die Erkenntnis, dass im elektrischen Feld bewegte Elektronen eine Wellenlänge besitzen, die um mehrere Zehnerpotenzen niedriger als die des Lichtes ist und die Tatsache, dass stromdurchflossene Spulen wie magnetische Linsen Elektronenstrahlen ablenken können, führten zur Idee des Elektronenmikroskops. Die Berliner Wissenschaftler Ruska und von Borries meldeten 1932 das Patent für das Transmissionselektronenmikroskop an.

Heute existieren zwei Haupttypen von Elektronenmikroskopen. Das Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) arbeitet nach dem Durchlichtprinzip. Das Untersuchungsobjekt wird in diesem Fall statt von Licht von einem Elektronenstrahl durchdrungen. Die optischen Linsen werden durch elektromagnetische Linsen ersetzt. Durch die unterschiedlichen atomaren Dichten in den Regionen des Objektes wird der Elektronenstrahl verschieden stark abgelenkt. Es sind Auflösungen von einem Millionstel Millimeter erreichbar. Elektronenstrahlen besitzen kein hohes Durchdringungsvermögen. Kompakte Objekte sind daher dieser Untersuchung nicht zugänglich. Dies führte zur Entwicklung des Rasterelektronenmikroskops (REM). Dessen Arbeitsweise ist mit einem Auflichtmikroskop vergleichbar. Beim REM wird die Objektoberfläche mit einem Elektronenstrahl beschossen. Beim Auftreffen der energiereichen Strahlen werden Elektronen aus der Oberfläche herausgeschlagen, von denen ein Teil durch einen geeigneten Detektor gesammelt werden. Die Objektoberfläche wird auf diese Weise zeilenweise abgetastet. Die Rasterabtastung liefert im Gegensatz zur TEM plastische Bilder der Objektoberfläche.

Beiden Verfahren haftet für die Untersuchung von biologischen Materialien ein entscheidender Nachteil an: das Arbeiten mit dem Elektronenstrahl ist nur im Vakuum möglich. Daher müssen biologische Untersuchungsproben durch Trocknen, Gefrieren oder chemische Fixierung präpariert werden. Diese Verfahren führen zu einer unvermeidbaren Veränderung des Untersuchungsobjektes. Zusätzlich wird bei der REM eine leitende Oberfläche benötigt, um die aufgeschossenen Elektronen abzuleiten. Die präparierten biologischen Proben sind durchweg Nichtleiter und werden deshalb mit Gold bedampft. Daraus resultieren eine Verschlechterung der Auflösung und der Verlust von Informationen im atomaren Größenbereich.

6.3.2 Probenvorbereitung

Eine Auswahl von Cornea-Präparaten, die für die Thermoanalytik (s. S. 103) angefertigt wurden, konnten zusätzlich elektronenmikroskopisch untersucht werden. Es handelt sich hierbei um die Proben, die einer Inkubation unter den im Abschnitt 6.2.4 genannten Bedingungen unterworfen waren, ohne dass die dort genannten Nachinkubationen in Puffer pH 7,4 angeschlossen wurde. Die Inkubation wurde in folgenden Lösungen durchgeführt:

1. Puffer pH 7,4
2. Puffer pH 7,4 mit $2,58 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ DPE
3. Puffer pH 7,4 mit $10,32 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ α -CD
4. Puffer pH 7,4 mit $10,32 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ β -CD
5. Puffer pH 7,4 mit $2,58 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ DPE und $10,32 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ α -CD
6. Puffer pH 7,4 mit $2,58 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ DPE und $10,32 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ β -CD

Anschließend wurden die Reste der Inkubationslösungen von den Corneae mit Puffer pH 7,4 abgespült, die außen anhaftende Flüssigkeit entfernt und auf der Endothelseite liegend unter den gleichen Bedingungen wie in 6.2.4 in einem Exsiccator über Kieselgel bei 25°C getrocknet.

6.3.3 Versuchsdurchführung

Die unmittelbare Vorbereitung der Präparate für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte durch die in diesem Bereich tätigen Mitarbeiter der Hochschule Wismar. Zuerst wurden von den trockenen Proben Schnitte angefertigt, die alle am Aufbau der Cornea beteiligten Schichten zeigten. Die Proben wurden anschließend in Leitmasse eingebettet und mit Gold bedampft. Die Aufnahmen erfolgten mit $4,00 \text{ kV}$ bzw. 15 kV im Rasterelektronenmikroskop in unterschiedlichen Vergrößerungen und Ausschnitten.

Tabelle 6.1: Mechanische Eigenschaften der Cornea-Proben für die Elektronenmikroskopie in Abhängigkeit von den zur Inkubation im Puffer befindlichen Substanzen

Inkubationslösung	mechanische Auffälligkeiten
Pufferlösung	einheitliche elastische Probe
Pufferlösung mit DPE	einheitliche elastische Probe
Pufferlösung mit α -CD	Verhärtung der Probe
Pufferlösung mit β -CD	Verhärtung der Probe
Pufferlösung mit DPE und α -CD	Verhärtung mit Zerfaserung
Pufferlösung mit DPE und β -CD	Verhärtung mit Zerfaserung

6.3.4 Ergebnisse

An den Corneae waren sowohl während der Inkubation als auch im Verlauf der Trocknung keine Auffälligkeiten zu beobachten. Makroskopisch betrachtet gab es zwischen den unterschiedlich behandelten Proben im getrockneten Zustand keine Unterschiede.

Bei der Vorbereitung der Corneae für die REM-Aufnahmen waren Materialunterschiede mechanisch feststellbar; auf Grund des großen Anteils des Stromas am Aufbau der Cornea wahrscheinlich ausschließlich Strukturveränderungen des Stromas. Beim Schneiden der Proben traten deutliche Unterschiede im mechanischen Verhalten der getrockneten Proben auf. Diese wurden durch die Mitarbeiter der Hochschule Wismar dokumentiert (Tab. 6.1).

Die erhaltenen Bilder (s. Anh. D ab S. 205) lassen strukturelle Schäden des cornealen Stromas erkennen. Eine einheitlich aussehende Struktur ist nur erkennbar, wenn die Corneae in Pufferlösung oder in DPE-haltiger Pufferlösung inkubiert wurden. Von den Epithel- bzw. den Endothel-Zellen sind keine Einzelstrukturen mehr zu erkennen; sichtbar sind lediglich die durch den Trocknungsprozess kompaktierten Reste, unabhängig von der verwendeten Inkubationslösung. Daher lassen sich keine Rückschlüsse auf die Auswirkungen der Inkubationen mit DPE und den Cyclodextrinen auf diese Gewebe ziehen.

Der Zusatz von Cyclodextrinen äußert sich in einer deutlichen Veränderung

der Proben im Bereich des Stromas. Die mit α - bzw. β -CD behandelten Corneae zeigen punktförmige, scheinbar in Längsschichten angeordnete Defekte und kleinere in dieselbe Richtung verlaufende Aufrisserscheinungen.

Am ausgeprägtesten sind die Schäden an den Proben, in denen DPE mit α - bzw. β -CD kombiniert zur Inkubation verwendet worden waren. Punktförmige Defekte sind nicht mehr feststellbar, dafür finden sich Bereiche mit generalisierten Defekten, die die Stromastruktur in Längsrichtung stark zerfasern.

Abbildung D.38 auf Seite 211 zeigt Details des Feinbaus des cornealen Stromas. Erkennbar ist die Lamellenstruktur der kollagenen Fasern an der mit DPE behandelten Probe. Aufnahmen einer intakten Lamellenstruktur an den mit Cyclodextrinen behandelten Proben waren nicht möglich. Hier kam es zu schuppigen Aufbrüchen der Struktur wie am Beispiel der DPE/ α -CD behandelten Probe (s. Abb. D.39, S. 212).

6.3.5 Diskussion

Das Hauptproblem der Elektronenmikroskopie bei der Untersuchung biologischer Proben tritt auch bei diesen Versuchen deutlich zu Tage. Auf Grund der für die Beständigkeit im Hochvakuum notwendigen Behandlung biologischer Materialien durch Gefrieren, chemisches Fixieren oder Trocknen kommt es zu erheblichen Veränderungen der Proben. Aussagen zu Strukturveränderungen, die vor diesem Eingriff in die Integrität der Probe erfolgt sind, müssen daher sehr zurückhaltend getroffen werden. Dies gilt insbesondere für die Trocknung, da hier Zellen, Zellverbände und Gewebe durch den Wasserverlust stark schrumpfen und deformieren. Die Feststellung der im lebenden System vorhandenen Größenverhältnisse wird erheblich behindert.

Eine generelle Aussage zur cornealen Toxizität oder Zytotoxizität an speziellen Geweben der Cornea ist an Hand dieser Proben nicht möglich. Es kann lediglich festgestellt werden, ob durch Kontakt mit einer Testsubstanz grundsätzlich eine Gewebsveränderung bzw. eine Wechselwirkung Substanz/Cornea aufgetreten ist. Eine Quantifizierung der Wirkung lässt sich nur nach groben Gesichtspunkten vornehmen und ist letztlich nicht objektivierbar.

Die Ergebnisse der getrockneten Proben lassen keinen Rückschluss zu, ob es in vivo tatsächlich zu Schäden am Stroma kommt. Als sicher gilt aber zumindest für α -CD eine nachgewiesene schädigende Wirkung (s. a. Kap. 3.2.2.3) in Konzentrationen ab 4 % [KANAI et al. 1989]. Daher ist für α -CD mit Sicherheit davon auszugehen, dass eine Wechselwirkung α -CD/Cornea-Gewebe auch in den verwendeten niedrigeren Konzentrationen stattgefunden hat.

Festzustellen ist weiterhin, dass unterschiedlich vorbehandelte Corneae den für alle Proben gleichzeitig und einheitlich abgelaufenen Trocknungsprozess nicht mit dem selben Ergebnis verlassen haben. Die elektronenmikroskopisch und mechanisch erkennbaren Unterschiede sind so erheblich, dass eine Rückführung auf individuelle Schwankungen der Probenstruktur als Begründung der Unterschiede auszuschließen ist. Wenn die Strukturveränderungen durch α -CD-Wechselwirkungen mit dem Gewebe zu den ermittelten Veränderungen geführt haben, ist anzunehmen, dass die unter Verwendung von β -CD aufgetretenen, vergleichbaren Veränderungen derselben Art ebenfalls auf eine Wechselwirkung mit dem cornealen Gewebe zurückzuführen sind. Wie oben schon erwähnt, rechtfertigt die Tatsachenfeststellung einer Wechselwirkung nicht, die corneale Toxizität der verwendeten Substanzen zu belegen. Für β -CD wurden schädigende Wirkungen am Auge bisher nicht beschrieben. Das mag sicher daran liegen, dass für praktische Einsatzzwecke die Löslichkeit in Wasser zu gering ist. Zumindest für das HP- β -CD sind aber auch in Konzentrationen von 12,5 % keine schädigenden Wirkungen dokumentiert (s. a. Kap. 3.2.2.3).

DPE wird in der Dauerapplikation verwendet, und es ist nicht mit akuten Schäden an der Cornea durch DPE zu rechnen. Die Ergebnisse nach der Inkubation in DPE-haltigem Puffer scheinen das zu bestätigen. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass es, wie in den enzymatischen Untersuchungen (Kap. 4) beschrieben, zum Abbau von DPE in der Cornea kommt. Es liegen neben DPE auch Pivalylsäure, Epinephrin und dessen Oxidationsprodukte in sehr geringen Mengen vor.

Auffallend ist die verstärkte Gewebsveränderung bei der Kombination der Cyclodextrine mit DPE. Hier scheinen sich die Wechselwirkungen von DPE, die nicht in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar waren, und der Cyclodextrine mit den Stroma gegenseitig zu verstärken.

Bei der DTA/TG konnten die messbaren Veränderungen am Gewebe, hervorgerufen durch die Kombination von DPE mit β -CD. Mit Hilfe eines mehrfachen angeschlossenen Inkubationsprozesse mit Puffer von insgesamt 180 min konnten diese Veränderungen rückgängig gemacht werden. Ob diese Reversibilität auch elektronenmikroskopisch nachweisbar ist, muss späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Kapitel 7

Permeation von Dipivefrin durch Schweinecornea

7.1 Allgemeine Bemerkungen

Das Auge hat für die gezielte systemische Applikation von Arzneistoffen keine Bedeutung. Dass der größte Teil der für die lokale Therapie verabreichten Arzneistoffe nach dem Abfließen über den Tränenkanal systemisch zur Resorption kommt, ist unbeabsichtigt, aber anatomisch gesehen nicht zu verhindern. Diese systemische Resorption stellt für eine Reihe von Arzneistoffen die Ursache der beobachteten, z. T. dramatischen Nebenwirkungen dar. Ein wichtiges Ziel bei der Optimierung von Ophthalmika ist die Verbesserung der Resorption, verbunden mit Reduzierung des Wirkstoffeinsatzes und damit auch einer reduzierten systemischen Aufnahme des Arzneistoffes.

Der Arzneistoffdiffusion ins Innere des Auges setzt die Cornea durch ihren Aufbau aus vielen z. T. recht unterschiedlichen Schichten einen großen Widerstand entgegen. Dabei spielen die Faktoren pH-Wert, Molekülmasse, Hydrophilie und Ionisierbarkeit der applizierten Arzneistoffe eine entscheidende Rolle für die Passage der Cornea. Das außen liegende Epithel lässt durch seinen lipophilen Charakter bevorzugt lipophile und undissoziierte Moleküle transzellulär passieren. Für hydrophile Arzneistoffe findet die Passage über Poren und wassergefüllte

Interzellularräume statt. Mit dem Erreichen des Stromas sind für das weitere Durchdringen der Cornea nun ausschließlich passive Diffusionsvorgänge in einer hydrophilen Schicht verantwortlich. Die lipophilen Substanzen, die nicht durch Ionisierung hydrophileren Charakter annehmen können, sind durch ihre schlechte Löslichkeit im wässrigen Stroma in der Regel deutlich in ihrer Verfügbarkeit im Auge eingeschränkt. Es ist daher für eine ideale Passage der Cornea wichtig, dass der verwendete Arzneistoff sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften besitzt. Auch Moleküle, die durch eine pH-abhängige Dissoziation ihre Polarität verändern, sind als Arzneistoff geeignet.

Ziel der Untersuchungen ist es, die Einflussnahme ausgewählter Cyclodextrine auf den Permeationsprozess von DPE zu untersuchen. Wie dem Kapitel 4 bekannt ist, nehmen die CD auch einen deutlich messbaren Einfluss auf die Metabolisierung von DPE durch Enzyme des cornealen Epithels. Durch Messung der Epinephrin-Konzentration im Akzeptor und im Donator wären Aussagen zu ablaufenden enzymatischen Prozessen während der Permeation möglich.

7.2 Grundlagen der Permeationsuntersuchung

7.2.1 Permeationsmodelle

Um Arzneistofffreisetzungen aus festen, halbfesten und flüssigen Arzneiformen zu untersuchen, bedient man sich verschiedener Modelle. Dabei ist der Verwendung von in-vitro-Modellen der Vorzug zu geben, da sie in aller Regel einfacher durchzuführen, schneller und billiger sind. Des Weiteren sind bei in-vivo-Modellen bzw. Human- und Tierversuchen die Fragen der menschlichen Ethik und des in diesem Jahr in das Grundgesetz der Bundesrepublik Deutschland als Staatsziel aufgenommenen Tierschutzes zu beachten.

Grundsätzlich ist beim Aufbau von Freisetzungsmodellen zwischen „Dissolutions-Modellen“ und „Membran-Modellen“ zu unterscheiden. Die zuerst genannten Modelle dienen vorrangig der Prüfung von festen peroralen Arzneiformen; einige wichtige Methoden sind im Europäischen Arzneibuch aufgeführt [EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH 3. AUSGABE 1997, NACHTRAG 2002]. Membran-

Modelle kommen zum Einsatz, wenn die Arzneiform vom Akzeptormedium aus chemischen oder physikalischen Gründen getrennt werden muss oder wenn die Diffusion durch eine Membran der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Arzneistofffreisetzung ist. Im ersten Fall dient die Membran lediglich als Grenzfläche zwischen den Kompartimenten (z. B. Gleichgewichtsdialyse) und stellt damit konstante Versuchsbedingungen für die Untersuchung des Einflusses von z. B. Hilfsstoffen auf die Freisetzung sicher. Im zweiten Fall stellt die Membran ein Modell für eine körpereigene Barriere dar, wobei entweder eine geeignete künstliche Membran (z. B. Nephrophan[®]) oder die natürliche Barriere selbst (Cornea, Haut, Dünndarmwand) verwendet werden.

Eine Reihe unterschiedlicher Modelle für die in-vitro-Untersuchung an Corneae verschiedener Spezies sind eingehend beschrieben worden. Besonders umfangreich sind die Untersuchungen an Kaninchen [MITRA und MIKKELSON 1988, SCHOENWALD und HUANG 1983, HUANG et al. 1983, RICHMAN und TANG-LIU 1990], am Rind [SIEFERT und KEIPERT 1997] und am Schwein [CAMBER 1985, BISLAT et al. 1990]. Mit den vorhandenen Modellen (nicht nur für die Cornea geeignet) lassen sich auch die Einflüsse von Cyclodextrinen und anderen Hilfsstoffen auf die Permeation von Arzneistoffen (z. B. Thalidomid [SIEFERT et al. 1999], Spironolacton [YUSUFF et al. 1991], Dexamethason [USAYAPANT et al. 1991]) untersuchen.

7.2.2 Biologischen Barrieren

Neben der spezifischen Funktion als Bestandteil des Sehorgans hat die Cornea eine Abschluss- und Barrierefunktion für das Auge. Durch ihre Lage kommt es zu intensivem Kontakt mit der Luft (mit den darin enthaltenen Partikeln, Bakterien und Schadstoffen) und ggf. zu groben mechanischen Kontakten (grobe Partikel und Gegenstände, aber auch Ophthalmika).

Die physikalische Funktion der Barriere wird durch den Schichtaufbau realisiert. Dabei spielt für die mechanische Festigkeit das Stroma die Hauptrolle. Den Schutz gegen das Eindringen von Fremdstoffen (auch Arzneistoffen) in das Auge gewährleistet das dichte, mehrschichtige Corneaepithel. Für die sogenannte temporäre Barriere stellt die Cornea lediglich die Unterlage für den Tränenfilm

dar, mit dessen Hilfe Fremdstoffe vom Auge gespült werden. Die Hauptreinigungsfunktion übernehmen die Augenlider, die durch ihre periodische Bewegung — in Reizsituationen vermehrt — neben dem Erhalt des Flüssigkeitsfilms auf der Cornea für die mechanische Entfernung von Fremdkörpern und Fremdstoffen sorgen. Daneben über die stoffwechselaktiven Gewebe der Cornea einen chemischen Schutz gegenüber Fremdschubstanzen aus. Besonders das Corneaepithel ist geeignet, eindringende Substanzen, u. a. Arzneistoffe wie DPE, zu metabolisieren.

Bei der Entwicklung von in-vitro-Modellen wird regelmäßig die temporäre Barriere außer Acht gelassen. Dies liegt zum einen daran, dass der sowohl periodische mechanische Wischvorgang des Augenlides als auch der Fluss der Träne schwer simulierbar sind, zum anderen in den zur Erfassung von Permeationsdaten notwendigen langen Verweilzeit der Arzneistoffe auf der Cornea.

7.2.3 Transport durch biologische Barrieren

Der Transport durch biologische Barrieren wird prinzipiell über zwei Hauptwege möglich: der transzelluläre und der parazelluläre Weg. Der transzelluläre Weg führt über die Permeation durch die Zellmembranen und das Zytoplasma. Auf Grund des lipophilen Membranaufbaus ist es der bevorzugte Weg für lipophile Substanzen sowie für Substanzen, für die in den Membranen spezifische aktive Transportsysteme existieren. Der parazelluläre Weg führt über wassergefüllte Zellzwischenräume — ist damit zwangsläufig nur für hydrophile Moleküle geeignet — und über die Tight junctions, deren Öffnung durch die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gesteuert wird. Während der Permeation besteht durch Enzyme, insbesondere beim transzellulären Weg, die Möglichkeit, dass eine Metabolisierung stattfindet. Man spricht in diesem Fall von einem „pseudo-first-pass-Effekt“.

7.2.4 Mathematisch-Physikalische Betrachtung

7.2.4.1 Diffusion

Diffusion ist die gegenseitige Durchmischung zweier Stoffe. Sie ist die Folge der thermischen Bewegungen und Schwingungen (im Falle einer Lösung) von Lösungs-

mittel und gelösten Teilchen. Große Moleküle erleiden so durch die Brownsche Molekularbewegung 10^{13} – 10^{15} Stöße in der Sekunde. Das mittlere Verschiebungsquadrat $\overline{x^2}$ während der Beobachtungsdauer τ ist:

$$\overline{x^2} = c\tau \quad (7.1)$$

$\overline{x^2}$... mittleres Verschiebungsquadrat

c ... const.

τ ... Beobachtungsdauer

Die Konstante c ist direkt proportional der Temperatur T und indirekt proportional dem Reibungsfaktor f . Unter Einbeziehung der Beobachtungszeit τ ergibt sich die Boltzmann-Konstante k als neuer Proportionalitätsfaktor:

$$\overline{x^2} = \frac{kT}{f} \quad (7.2)$$

$\overline{x^2}$... mittleres Verschiebungsquadrat

k ... Boltzmann-Konstante

T ... absolute Temperatur

f ... Reibungsfaktor

Bei statistischer Gleichverteilung der Teilchen wird der Mittelwert $\bar{x} = 0$, da eine Verschiebung x in jede Richtung gleich wahrscheinlich ist. Auch bei einem Konzentrationsgefälle ist die thermische Bewegung eines einzelnen Teilchens streng statistisch verteilt und nicht vorhersagbar. Bei der statistischen Betrachtung aller Teilchen ergibt sich jedoch ein gerichteter Teilchenstrom, der an jedem Ort dem Konzentrationsgradienten proportional ist und dessen Richtung der des Gradienten entgegen gesetzt ist. Beschreibbar ist diese Bewegung durch das 1. und 2. Fick'sche Gesetz (Gleichungen [7.3](#) und [7.5](#)).

Aus thermodynamischer Sicht ist nicht der Konzentrationsgradient, sondern der Gradient der thermodynamischen Aktivität der Teilchen die Triebkraft der

Diffusion. Zur messtechnischen Vereinfachung wird aber meist als Basis der Berechnung der Konzentrationsgradient verwendet. Neben der thermodynamischen Aktivität wird der kinetische Verlauf der Diffusion durch die Beweglichkeit der Teilchen bestimmt. Wichtige Faktoren der Teilchenbeweglichkeit sind u. a.:

- die chemische Struktur
- die Molekülgröße
- Wechselwirkungen
- das Dissoziationsverhalten
- und die Temperatur.

Diese, selten einzeln bestimmbaren Faktoren, werden mit Hilfe eines Proportionalitätsfaktors, dem Diffusionskoeffizienten D [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$], beschrieben.

Derartige Vorgänge laufen nach dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik spontan und irreversibel ab. Die Gesamtentropie ΔS_{tot} des betrachteten geschlossenen Systems nimmt daher zu: $\Delta S_{tot} > 0$.

7.2.4.2 Fick'sche Diffusionsgesetze

Die Diffusionsgesetze von Fick aus dem Jahre 1855 beschreiben den Diffusionsvorgang in Abhängigkeit eines Konzentrationsgefälles in einem Medium in allen drei Dimensionen. Zur Vereinfachung wird die Anzahl der Raumrichtungen reduziert, im Falle der Diffusion durch Membranen ist die Berechnung auf Grundlage einer eindimensionalen Betrachtung sinnvoll. Im 1. Fick'schen Gesetz (Gl. 7.3) wird die proportionale Beziehung des Diffusionsflusses $J = \frac{dm}{dt}$ je Einheitsfläche zum differentiellen Konzentrationsgradienten beschrieben.

$$J = \frac{dm}{dt} = -D \frac{dc}{dx} \quad (7.3)$$

J	...	Diffusionsfluss
m	...	Masse
t	...	Zeit
D	...	Diffusionskoeffizient
c	...	Konzentration
x	...	Raumdimension x

In einem isotropen Medium lässt sich die Arzneistoffmasse M , die über eine Querschnittsfläche A diffundiert, nach Gleichung 7.4 berechnen. Voraussetzung für diese praktische Anwendung des 1. Fick'schen Gesetzes ist das Vorhandensein eines stationären oder quasistationären Konzentrationsgefälles.

$$\frac{dM}{dt} = -AD \frac{dc}{dx} \quad (7.4)$$

M	...	Arzneistoffmasse
t	...	Zeit
A	...	Diffusionsfläche
D	...	Diffusionskoeffizient
c	...	Konzentration
x	...	Raumdimension x

Wenn durch den Strom der diffundierenden Moleküle der Konzentrationsgradient verändert wird, er somit räumlich und zeitlich instationär ist, muss die oben angegebene Gleichung 7.3 allgemeineren Charakter erhalten. Unter Verminderung der Gleichung um die Variable m führt die mathematische Ableitung zu einer partiellen Differenzialgleichung, die als 2. Fick'sches Gesetz (Gl. 7.5)

bekannt ist. Das Gesetz macht Aussagen über die räumliche und zeitliche Konzentrationsverteilung.

$$\left(\frac{\delta c}{\delta t}\right)_x = D \left(\frac{\delta^2 c}{\delta x^2}\right)_t \quad (7.5)$$

Die unendlich vielen Lösungen dieser Gleichung müssen durch eine Reihe von Anfangs- und Randbedingungen eingegrenzt werden. Für den Fall einer Membrandiffusion (Schichtdicke h) werden eine konstante Ausgangskonzentration c_1 des Donators an der Stelle $x = 0$ und am Akzeptor $x = h$ die konstante Konzentration $c_2 = 0$ gefordert. Dieses Konzentrationsgefälle ist praktisch nicht erreichbar, daher arbeitet man unter weiterer Vereinfachung mit den sogenannten sink-Bedingungen; für diese gilt: $0 < c_2 < \frac{1}{10}c_1$. Vernachlässigt werden bei Membrandiffusionen ebenfalls Grenzflächeneffekte, die oben bereits erwähnte Verwendung von Konzentrationen anstelle der Aktivitäten, die Diffusion in die nicht betrachteten Raumrichtungen y und z sowie die Tatsache, dass der Diffusionskoeffizient als Proportionalitätsfaktor nicht konstant ist. Unter Einbeziehung des 1. Fick'schen Gesetzes (Gl. 7.3) für den Diffusionsfluss J pro Flächeneinheit ergibt sich nach der Integration für die Zeit t und für einen gegebenen Querschnitt A die durch eine isotrope Membran der Dicke h transportierte Arzneistoffmenge (Gl. 7.6).

$$M = DA \frac{c_2 - c_1}{h} t \quad (7.6)$$

7.2.4.3 Diffusionskoeffizient

Zwischen dem makroskopischen Diffusionskoeffizienten D und dem molekularen Reibungsfaktor f ist in Anlehnung an Gleichung 7.2 ein Zusammenhang darstellbar:

$$D = \frac{kT}{f} \quad (7.7)$$

Für einen homogenen Diffusionsraum, in dem der Diffusionskoeffizient konstant ist und keine Vorzugsrichtung aufweist, ist D für sphärische Teilchen mit

Hilfe der Stokes-Sutherland-Einstein-Gleichung (Gl. 7.8) definierbar.

$$D = \frac{RT}{N} \frac{1}{6\pi\eta r} \quad (7.8)$$

R ... allgemeine Gaskonstante

T ... absolute Temperatur

N ... Loschmidt-Zahl

η ... intrinsische Viskosität

r ... Teilchenradius

Der Reibungsfaktor f ist abhängig von der Molekülgröße und der geometrischen Form der Moleküle. Daher ist auch der Diffusionskoeffizient von der Molekülmasse abhängig, ein linearer Zusammenhang besteht jedoch nicht. Näherungsweise, unter Vernachlässigung der Molekülform, kann man zur Abschätzung des Diffusionsverhaltens für niedermolekulare Substanzen von $D \sim \frac{1}{\sqrt{M_r}}$ ausgehen. Der Diffusionskoeffizient weist eine Abhängigkeit von der Temperatur auf. Diese Abhängigkeit ist nicht linear, weil als Variablen in der Berechnung sowohl der Reibungsfaktor f als auch die intrinsische Viskosität η temperaturabhängig sind und mit steigender Temperatur sinken. In biologischen Geweben erstrecken sich Diffusionsprozesse über verschiedene Diffusionsräume mit unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten, selbst innerhalb einer definierten Gewebeschicht ist durch den Aufbau und die Funktion der Zellen und Zellverbände keine homogene Struktur für den Diffusionsprozess gegeben.

Die Gültigkeit der Fick'schen Gesetze ist auf einen homogenen Diffusionsraum beschränkt, in dem die Orts-, Zeit-, Richtungs-, Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten bewusst vernachlässigt wird. Daher ist für jedes pharmazeutische Diffusionsmodell zu prüfen, ob die Vereinfachung der Bedingungen zulässig und mit den Diffusionsgesetzen vereinbar ist.

7.2.4.4 Permeation durch eine Membran

Bei dem einfachsten Fall dieses Modells ist eine Membran der Schichtdicke h von der einen Seite mit einer Donatorlösung umspült, die einen großen Überschuss an Arzneistoff enthält, die andere Seite von einem Akzeptor, der praktisch unbegrenzt Arzneistoff aufzunehmen vermag. Unter Annahme einer eindimensionalen Diffusion und dem Fehlen von Grenzflächenphänomenen liegt hier der Zustand der perfect-sink-Bedingungen vor. Der Transport läuft unter diesen Voraussetzungen membrangesteuert ab. Mit Hilfe der Fick'schen Gesetze lassen sich allgemeine Lösungen finden, die den Konzentrationsgradienten in der Membran beschreiben. Der Prozess nähert sich im Laufe der Zeit dem quasistationären Zustand, d. h. $\frac{dc}{dt} = 0$ und $\frac{dc}{dx} = \text{const.}$, an.

In der Praxis hat man es mit den Einschränkungen für sink-Bedingungen, wie unter Kapitel 7.2.4.2 aufgezeigt, zu tun. Des Weiteren ist aus pharmazeutischer Sicht weniger der Konzentrationsgradient als vielmehr die permeierte Stoffmenge M interessant. Nach Integration des Diffusionsflusses J an der Stelle $x = 0$ über t und unter Vernachlässigung der Exponentialglieder, die für große Werte von t unbedeutend werden, lässt sich die permeierte Stoffmenge m berechnen.

$$m = AD \frac{c_h}{h} t - \frac{Ac_h h}{6} \quad (7.9)$$

c_h ... Konzentration für $x=h$

Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergibt die sogenannte lag-time t_{lag} . Sie ist eine Größe zur Beschreibung von Permeationen und ihres Fließgleichgewichts und über $t_{lag} = \frac{h^2}{6D}$ geeignet zur Schätzung des Diffusionskoeffizienten.

Nur für sehr dünne Membranen, für die gilt: $Ac_h h \ll 6$, vereinfacht sich Gleichung 7.9 zu:

$$m = AD \frac{c_h}{h} t \quad (7.10)$$

Wie zu sehen, stimmt die Gleichung 7.10 nach vielen getroffenen Vereinfachungen mit der trivialen Lösung nach Gleichung 7.6 für $\frac{dc}{dt} = 0$ überein.

7.2.4.5 Verteilungskoeffizient

Bei der Diffusion durch Lipidmembranen spielen Verteilungsgleichgewichte zwischen Akzeptor- bzw. Donatorlösung und der Membran eine Rolle bei der Permeation. Wie schon unter 7.2.4.1 ausgeführt, verwendet man zur Vereinfachung die Konzentration des Stoffes anstatt dessen Aktivität, des Weiteren wird stillschweigend die Temperaturabhängigkeit der Lösungseigenschaften vernachlässigt. Somit lässt sich ein scheinbarer partieller Verteilungskoeffizient K_V errechnen: $K_V = \frac{c_{Membran}}{c_{Lösung}}$. Unter der Annahme, dass die Einstellung des Verteilungsgleichgewichts beliebig schnell erfolgt, gilt unter den bisher genannten Einschränkungen für das quasistationäre Fließgleichgewicht:

$$\frac{dm}{dt} = AD \frac{K_V \cdot c_{Lösung}}{h} \quad (7.11)$$

Wie aus der Gleichung 7.11 ersichtlich, ist die permeierte Stoffmenge direkt proportional dem Verteilungskoeffizienten. Da die Verteilungskoeffizienten von Gewebeschichten experimentell nur unzulänglich oder gar nicht zugänglich sind, behilft man sich mit der Bestimmung des n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten als Richtwert bei der Abschätzung bzw. Beurteilung von Permeationsdaten.

7.2.4.6 Permeabilitätskoeffizient

Mit Hilfe des Permeabilitätskoeffizienten P lassen sich alle konstanten Parameter einer Permeation zusammenfassen. Das ist auch dann notwendig, wenn es sehr schwierig oder unmöglich ist, Einzelparameter zu bestimmen. Der Permeabilitätskoeffizient ist die Zusammenfassung des Diffusionskoeffizienten D , der Schichtdicke h und des Verteilungskoeffizienten K_V :

$$P = AD \frac{K_V D}{h} \quad (7.12)$$

P ... Permeabilitätskoeffizient

Mit Hilfe des Permeabilitätskoeffizienten ist eine Aussage über und die Berechnung des Diffusionsflusses auch an komplexen biologischen Barrieren (z. B. Cornea, Haut, Schleimhäute) möglich. Unter sink-Bedingungen im Fließgleichgewicht ergibt sich der Diffusionsfluss nach: $J = P \cdot c_0$.

7.2.4.7 Diffusion durch „Poren“

Bei biologischen Membranen kommen „Poren“ dem parazellulären Transportweg gleich. Auch Bereiche besonders hoher Permeabilität und poröse Abschnitte können damit beschrieben werden. Bei künstlichen Membranen lassen sich mit Hilfe von Polymeren direkt Poren von definierter Größe ausbilden. Es kommt so, neben dem passiven Permeationsweg durch das Membranmaterial, zu einem parallelen Transport durch die Poren. Der Idealfall geht von zylindrischen Poren aus, deren Durchmesser das 50-fache des Moleküldurchmessers beträgt und so einen von Randeffekten freien Diffusionsstrom entlang des Konzentrationsgefälles ermöglicht. Der Permeabilitätskoeffizient der Gesamtmembran ergibt sich somit aus der gewichteten Addition der Permeabilitätskoeffizienten (Gl. 7.13) für die einzelnen Permeationswege. Für deren Koeffizienten f gilt: $\sum_1^n f_n = 1$ (n =Anzahl der parallelen Permeationswege).

$$P = f_M P_M + f_P P_P \quad (7.13)$$

f_M ... Anteil der Membran

P_M ... Permeabilitätskoeffizient der Membran

f_P ... Anteil der Poren

P_P ... Permeabilitätskoeffizient der Poren

7.2.4.8 Diffusion durch mehrschichtige Membranen

Bei der Diffusion eines Arzneistoffes durch eine Barriere ist selbst im Fall einer einschichtigen Membran der Diffusionsprozess nicht auf diese beschränkt. Auf

beiden Seiten der Membran bildet die umgebende Flüssigkeit sogenannte Diffusionsschichten. In diesen Schichten werden die Stoffe nicht durch Konvektion, sondern fast ausschließlich durch Diffusion transportiert. Somit ist im einfachsten Fall ein dreischichtiges System für die Diffusion verantwortlich. Daher gilt, dass sich der reziproke Gesamtpermeabilitätskoeffizient aus der Summe der reziproken Permeabilitätskoeffizienten der einzelnen Schichten n ergibt. Für $n = 3$ gilt:

$$\frac{1}{P_{ges}} = \frac{1}{P_1} + \frac{1}{P_2} + \frac{1}{P_3} \quad (7.14)$$

Betrachtet man die Cornea als Diffusionsbarriere und zieht die von ihrer Dicke h größten Schichten Stroma, Epithel und Endothel mit in die Berechnung ein, erhält man unter Berücksichtigung der Gleichung 7.12 als Term für den Permeabilitätskoeffizienten eines fünfschichtigen Systems:

$$\frac{1}{P} = \frac{h_1}{D_1 K_{V_1}} + \frac{h_1}{D_2 K_{V_2}} + \frac{h_3}{D_3 K_{V_3}} + \frac{h_4}{D_4 K_{V_4}} + \frac{h_5}{D_5 K_{V_5}} \quad (7.15)$$

h_n ... Dicke der Schicht n

D_n ... Diffusionskoeffizient der Schicht n

K_{V_n} ... Verteilungskoeffizient der Schicht n zwischen
der Schicht und dem umgebenden Lösungsmittel
bzw. der Nachbarschicht

Bei Betrachtung der Gleichung 7.15 wird deutlich, dass eine Auflösung nach P für eine mathematische Berechnung wenig sinnvoll ist. Die Bestimmung der Verteilungs- und der Diffusionskoeffizienten für jede einzelne Schicht stellt im Allgemeinen eine analytisch nicht zu lösende Aufgabe dar.

7.2.4.9 Apparenter Permeabilitätskoeffizient

Die Lösung des Problems, einen wahren Permeabilitätskoeffizienten nicht berechnen zu können, liegt in der Verwendung eines „black-box“-Modells, bei dem ohne

Kenntnis der inneren Vorgänge ein Ausgangssignal (hier: die permeierte Arzneistoffmenge) registriert wird, das sich als Reaktion auf ein gesetztes Eingangssignal (hier: die Donatorkonzentration) ergibt. Für die Nutzung sind einige Vorbedingungen notwendig:

1. Das betrachtete System befindet sich im quasistationären Fließgleichgewicht.
2. Es herrschen sink-Bedingungen.
3. Die Ausgangskonzentration c_0 ist konstant.

Nach dem ersten Fick'schen Gesetz (Gl. 7.3) lässt sich aus den ermittelten Permeationsdaten ein Permeabilitätskoeffizient, der als apparenter oder effektiver Permeabilitätskoeffizient P_{app} bezeichnet wird, berechnen.

$$P_{app} = \frac{\Delta m}{\Delta t} \cdot \frac{1}{60 \cdot A \cdot c_0} \quad (7.16)$$

P_{app}	...	apparenter Permeationskoeffizient [cm·s ⁻¹]
m	...	permeierte Arzneistoffmasse [mg]
t	...	Permeationsdauer [min]
60	...	Umrechnungsfaktor von Minuten in Sekunden
A	...	Diffusionsfläche [cm ²]
c_0	...	Donatorkonzentration [mg·ml ⁻¹]

Dieses Black-box-Modell reagiert als Summe vieler verschiedener Parameter. An dem unter Kap. 7.2.4.8 gewählten Beispiel der Cornea sind das die Diffusionsvorgänge an drei Schichten verschiedener Zellverbände und den zwei sich nach außen anschließenden stationären wässrigen Diffusionsschichten. Innerhalb der zellulären Verbände finden eine Vielzahl von Transportvorgängen parallel statt: die transzelluläre Diffusion, die parazelluläre Diffusion sowie gegebenenfalls aktive Transportprozesse. Gleichzeitig kann es besonders im stoffwechselaktiven Bereich der Cornea, dem Epithel, zu Metabolisierungsreaktionen kommen,

die scheinbar die Permeabilität der Cornea herabsetzen. Bei solchen komplexen Vorgängen ist eine Differenzierung der einzelnen Teilleistungen schwer oder gar nicht möglich.

7.3 Versuchsdurchführung

7.3.1 Modellaufbau

Grundlage der Versuche bildet ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Permeationsmodell, das zunächst für Gleichgewichtsdialysezellen konzipiert [KEIPERT und VOIGT 1975] und später als Rindercornea-Permeationsmodell [SIEFERT und KEIPERT 1997, SIEFERT 1998] weiterentwickelt wurde. In der Folge wurde das bestehende Modell in den Größenverhältnissen auch den Permeationsuntersuchungen mit Schweinecornea angepasst [SCHOLZ et al. 2002].

Das Permeationsmodell besteht aus zwei Halbzellen aus Polyacryl®. Eine ringförmige donatorseitige Vertiefung und als Gegenstück eine ringförmige Erhebung auf der Akzeptorseite stellen die Fixierungselemente für die Cornea dar, sodass die natürlicherweise vorhandene Krümmung der Cornea annähernd aufrecht erhalten bleibt. Das Donator- und das Akzeptorkompartiment sind durch V-förmig angeordnete Röhren bei geschlossener Zelle zugänglich, um die Akzeptor- und Donatorflüssigkeit einfüllen oder umpumpen und während der Permeationsuntersuchung Proben entnehmen zu können.

7.3.2 Permeationsversuche

Für die Permeationsstudien waren gezielt CD aus der Testpalette auszuwählen. Bei der Entscheidung spielten die vorher geprüften Faktoren Wechselwirkung CD/DPE, Einfluss auf enzymatische Abläufe sowie Wechselwirkungen Gewebe/CD die entscheidende Rolle. Zur Überprüfung gelangten nach den enzymatischen Versuchen als besonders potent wirkend gefundene HP- β -CD, welches gleichzeitig eine hohe Affinität zu DPE aufweist, das in beiden Beziehungen als weniger aktiv eingeschätzte γ -CD und schließlich α -CD wegen seiner hohen, z. T.

schädigenden Wechselwirkung an cornealem Gewebe (s. Kap. 3.2.2.3). Neben dem CD-Einfluss auf die Permeation von DPE sollten gleichzeitig die im Epithel ablaufenden enzymatischen Prozesse erfasst werden (Erfassung von Epinephrin).

Tabelle 7.1: Bedingungen für die Permeationsuntersuchungen

Donatorvolumen	1,0 ml
Akzeptorvolumen	1,5 ml
Zeitdauer	300 min
Probenintervall	30 min
Temperatur	33±0,5 °C
Akzeptor	Puffer pH 7,4
Startkonzentrationen im Donator (Puffer pH 7,4)	
DPE	2,58 mmol·l ⁻¹
α-CD	123 mmol·l ⁻¹
HP-β-CD	35, 70, 140 mmol·l ⁻¹
γ-CD	123 mmol·l ⁻¹

Von frischen Schweineaugen wurden die Corneae abpräpariert und nach gründlichem Spülen mit Puffer, um anhaftendes Blut zu entfernen, in die Zellen eingelegt. Nach Verschluss der Zellen wurden diese mit Akzeptor- und Donatormedium gefüllt und in den temperierten Inkubator überführt. Die Zellen wurden mit einem horizontalen Exzenter bei einer Drehzahl von 100 min⁻¹ bewegt. Die Probennahme von je 100 µl nach jeweils 30 min aus Akzeptor und Donator erfolgte unter Ersatz des Volumens durch die entsprechenden Ausgangslösungen. Der Gehalt der gewonnenen Proben an DPE und EPI wurde unmittelbar nach der Entnahme mittels HPLC (s. Kap. A.1.2) bestimmt.

7.3.2.1 Ergebnisse und Diskussion

Ausgangspunkt der Versuche waren die Permeation von DPE und die Bestimmung des dabei entstehenden EPI ohne Beeinflussung durch die CD. (Die gefundenen EPI-Konzentrationen im Donator entsprachen immer den EPI-Konzentration im Akzeptor. Deshalb wird im Weiteren auf eine gesonderte Darstellung der

Stoffmengen von EPI im Donatorkompartiment verzichtet.) Abbildung 7.1 gibt den Verlauf der Permeation von DPE und die sich bildende Menge EPI ohne die Einflussnahme eines Zusatzes von CD wieder.

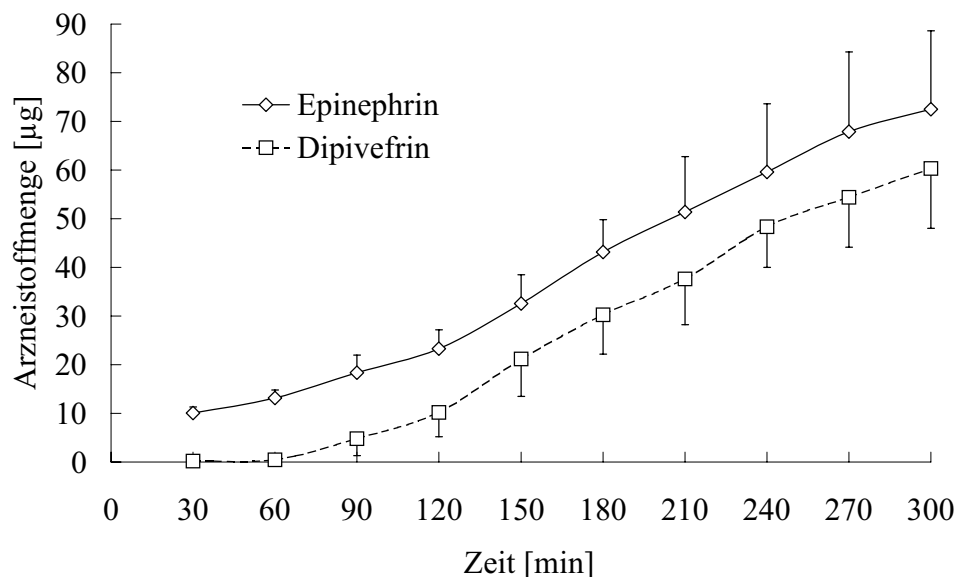


Abbildung 7.1: Permeierte Menge von DPE und während der Permeation enzymatisch gebildete Menge von EPI; $\bar{x} \pm s$, $n=3$

Auffallend ist das Auftreten von EPI im Akzeptor in messbaren Mengen noch vor der Passage von DPE. Offensichtlich beginnt mit dem Aufbau des Konzentrationsgradienten von DPE in der Cornea die Metabolisierung zum EPI, das dann zu gleichen Teilen entsprechend dem Konzentrationsgefälle in das Akzeptor- und das Donatorkompartiment diffundiert. Diese Metabolisierung erfasst in der Anfangsphase der Permeation den Großteil des in die Cornea eindiffundierten DPE.

Unter Zusatz von α -CD (s. Abb. D.40, S. 213) kommt es zu einer schnelleren Passage von DPE innerhalb der ersten Stunde der Permeation, während die Bildung von Epinephrin nicht beeinflusst zu sein scheint. Diese Resultate decken sich mit den Angaben über α -CD, für das eine corneale Toxizität bekannt ist (s. Kap. 3.4) und mit den Ergebnissen der enzymatischen Untersuchungen (s. Kap. 4), wonach eine Einflussnahme von α -CD auf den Verlauf der enzymatischen Reaktion ausgeschlossen werden kann.

Bei Einsatz von γ -CD (s. Abb. D.41, S. 213) erfolgt eine Reduktion auf ca.

28 % der permeierten DPE-Menge im Vergleich zur Permeation ohne CD nach 300 min. Die schwachen festgestellten Wechselwirkungen γ -CD/DPE sind offensichtlich ausreichend, um die Permeation durch Bildung großer, die Cornea nicht passierender Komplexe einzuschränken. Im Gegenteil dazu ist die gebildete EPI-Menge erheblich größer. Möglicherweise sind geringste Mengen γ -CD in der Lage, in das Epithel einzudringen und die im Kapitel 4 für geringe Mengen γ -CD beschriebene Beschleunigung des enzymatischen Umsatzes auszulösen. Die trotz Wechselwirkung γ -CD/DPE in die Cornea eindringende DPE-Menge könnte zum überwiegenden Teil als Substrat für die Bildung von EPI dienen.

Ein noch stärkerer Effekt auf die Permeation wird durch HP- β -CD verursacht (s. Abb. D.42). Die DPE-Menge nach 300 min beträgt nur noch 23–27 % der ohne CD-Einfluss gemessenen Menge. Die Betrachtung der Kurvenverläufe für die unterschiedlichen Konzentrationen von HP- β -CD (35, 70, 140 mmol·l⁻¹) zeigt keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationsunterschiede des CD auf die Permeation. Die im Vergleich zu γ -CD wesentlich stärkeren Wechselwirkungen mit DPE sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass nicht wie bei γ -CD eine Beschleunigung der EPI-Bildung erfolgt (s. Abb. D.43). Durch die Komplexbildung wird eine Penetration von DPE in die Cornea infolge der sich bildenden großen Moleküle behindert. Das führt zu einer geringeren Konzentration von DPE im Akzeptor und durch die geringere Penetration des DPE in die Cornea als Substrat für EPI zu einer geringeren Bildungsquote als bei γ -CD. Dass sich, ähnlich dem γ -CD, eine Beschleunigung durch geringe Mengen HP- β -CD im Epithel positiv auf die Bildung von EPI auswirkt, wird durch ein verringertes Substratangebot verhindert.

In Tabelle 7.2 sind die wichtigsten beschreibenden Parameter für die Permeationen von DPE, mit und ohne Einfluss von CD, aufgeführt. Die angegebene lag-time (t_{lag}) und der apparente Permeabilitätskoeffizient (P_{app}) wurden entsprechend den theoretischen Vorbetrachtungen (s. Kap. 7.2.4) auf Grundlage des Zeitintervalls von 60–300 min für das quasistationäre Fließgleichgewicht aus den experimentellen Daten berechnet. Einige Einschränkungen hinsichtlich P_{app} sind zusätzlich zu machen. So spiegelt P_{app} nicht das Permeationsverhalten von DPE durch Diffusion durch die Cornea wider, sondern ist ein um die metabolisierte DPE-Menge verminderter Wert. Die metabolisierten Arzneistoffmengen sind u. a. von den zugesetzten Hilfsstoffen abhängig. Damit ist P_{app} als Vergleichswert

unterschiedlicher Permeationsbedingungen durch CD-Zusatz ungeeignet. Lediglich eine grobe erste Orientierung wird durch P_{app} ermöglicht. Eine Aufrechnung der EPI-Mengen auf P_{app} erscheint wenig sinnvoll, da das EPI entsprechend dem Konzentrationsgefälle sowohl in Akzeptor- als auch Donator-Richtung diffundiert. Des Weiteren ist die Diffusionsgeschwindigkeit nicht identisch mit der von DPE.

Tabelle 7.2: Permeabilitätskoeffizienten, lag-time und permeierte Gesamtmenge nach 300 min ($Q_{300\text{ min}}$) der Versuche in Abhängigkeit der Donatorzusammensetzung, $\bar{x} \pm s$, n=3

Donator	P_{app} [$10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$]	t_{lag} [min]	$Q_{300\text{ min}}$ [μg]
ohne CD	$8,31\pm 2,56$	58	$60,3\pm 12,3$
α -CD 123 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$	$10,1\pm 2,42$	39	$78,9\pm 10,7$
γ -CD 123 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$	$1,84\pm 0,42$	0	$17,2\pm 4,7$
HP- β -CD 35 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$	$2,08\pm 0,54$	32	$16,7\pm 6,1$
HP- β -CD 70 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$	$2,00\pm 0,46$	43	$15,4\pm 3,5$
HP- β -CD 140 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$	$1,89\pm 0,51$	47	$14,3\pm 11,1$

Kapitel 8

Forcierte, umgekehrte Permeation

8.1 Allgemeine Bemerkungen

Einen großen Raum bei der Entwicklung und Optimierung von Ophthalmika nehmen Permeations- und Penetrationsstudien ein. Dabei wurde der Durchtritt durch und die Einlagerung von Arznei- und Hilfsstoffen in corneales und sklerales Gewebe untersucht. Die bevorzugten Quellen für die Gewinnung der Gewebe sind Kaninchen-, Schweine- und Rinderaugen.

Die verwendeten Permeationszellen unterschieden sich z. T. erheblich in ihrer technischen Ausführungen. Von den zwei Einzelkompartimenten dient eines als Donator, das zweite als Akzeptor. Die Kompartimente sind z. T. unterschiedlich groß. Es existieren Modelle, bei denen sich die Konzentrationsunterschiede in den Kompartimenten ausschließlich durch Diffusion ausgleichen, in anderen befindet sich die gesamte Apparatur in Rotation oder auf einem Exzenter, oder es befinden sich geeignete Rührvorrichtungen in den Kompartimenten. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, die Kompartimente mit externen Lösungsmittelvorräten zu verbinden und durch Umpumpen einen schnelleren Konzentrationsausgleich im Akzeptor zu erreichen. Im Falle des Akzeptorkompartiments nutzt man die Vergrößerung des Volumens häufig zur Senkung der Stoffkonzentration, um die gesamte Permeation unter sink-Bedingungen durchführen zu können.

Die Mehrzahl der bisher für Untersuchungen der Cornea verwendeten Modelle arbeitet mit drucklosen Zellen mit vertikal angeordneter Membran. Einziger Antriebsfaktor für die Permeation ist dabei die unterschiedliche Aktivität der Arzneimittel und Hilfsstoffe in Donator und Akzeptor. Als Untersuchungsobjekte dienten eine Vielzahl von Arzneistoffen, die modellhaft oder für den Einsatz in Ophthalmika untersucht wurden. Weniger Beachtung schenkte man bislang der Tatsache, dass auch Wasser an den Permeation- und Penetrationsvorgängen beteiligt ist und dass der hydrostatische Druck Einfluss auf die Permeation nehmen kann.

8.2 Theoretische Grundlagen

Bisher sind keine quantitativen Aussagen über einen modellhaften Durchtritt von Wasser durch die gesamte Cornea von endothelial nach epithelial bekannt. Betrachtet wurden bisher nur die Übergänge Träne-Epithel-Stroma und Kammerwasser-Endothel-Stroma. Bekannt ist, dass physiologischerweise beim Menschen kontinuierlich $5\ \mu\text{l}$ Kammerwasser pro Stunde und cm^2 in das Stroma durch Diffusion einfließen [MISHIMA 1982], um durch mitgeführte Substrate den Stoffwechsel des Gewebes sicherzustellen [HOCKWIN 1985b]. Durch die Endothelzellen werden als Folge des aktiven Bicarbonattransports vom Stroma in das Kammerwasser das Wasser aus dem Stroma und mit ihm die Stoffwechselprodukte in das Kammerwasser geleitet [FISCHBARG et al. 1985, GREEN 1991]. Die endotheliale „Pumpe“ hat eine konstante Kapazität, die nur durch pathologische Zustände beeinflusst wird [KLYCE und CROSSON 1985].

Ein ähnlicher Austauschvorgang, jedoch in schwächerem Ausmaß, findet am Epithel statt. Ein aktiver Transportprozess findet hier für die Cl^- -Ionen, die aus dem Stroma in die Tränenflüssigkeit gebracht werden [ZADUNAISKY 1966, MARSHALL und KLYCE 1983]. In Folge des Transportes der Cl^- -Ionen strömt Wasser aus dem Stroma in die Tränenflüssigkeit nach. Der Cl^- -Carrier repräsentiert 50 % des gesamten aktiven Ionentransports des Epithels. Durch Stimulation mit DPE (s. Kap. 3.2.1.5) erhöht sich dieser Anteil am Gesamttransport auf 75 % [KLYCE et al. 1973], das entspricht einer Verdreifachung des Cl^- -Transportsniveaus. Die Kapazität des Cl^- -Carriers im Epithel wird physiologischerweise über sym-

pathische Innervation reguliert [KLYCE und CROSSON 1985] — demgegenüber ist beim Endothel ein neurophysiologischer Einfluss nicht bekannt. Damit nimmt das Epithel neben seiner Hauptfunktion als Barriere für Elektrolyte und Wasser aktiv an der Hydratationssteuerung des Stromas teil.

Die Möglichkeit der Diffusion von Nährstoffen, Stoffwechselprodukten, Ionen und Wasser sowohl durch das Endothel als auch durch das Epithel ist ein physiologisch essentieller Vorgang für den Stoffwechsel der Cornea (s. a. Kap. 3.1.2).

Die Wasser-Durchlässigkeit des humanen Epithels ist nach Stanley um den Faktor 3,4 geringer als die des Endothels, für Na^+ um den Faktor 100 [STANLEY 1972]. Schütte gibt als relative Diffusionswiderstände für die Gesamtelektrolyte in den Geweben Epithel, Stroma und Endothel Werte im Verhältnis von 2000:1:10 an [SCHÜTTE 1987]. Der höhere Widerstand im Vergleich zu Stanley ergibt sich aus der Messung der Gesamtelektrolyte, wobei auch die größeren, langsamer diffundierenden zwei- und dreiwertigen Ionen in den Wert mit eingingen. Der Anteil der Ionen, die auf der parazellulären Route das Endothel passieren, liegt bei >99 % [HODSON und WIGHAM 1987]. Im Vergleich zu den Unterschieden der Diffusionswiderstände für Ionen zwischen Endothel und Epithel (Faktor 100–200, je nach Ionenart), scheint der Unterschied für den Diffusionswiderstand des Wasser mit einem Faktor von 3,4 eher gering zu sein. Nach Hodson ist für das Stroma, einem azellulären Gewebe, die Permeabilität für Wasser ungefähr dieselbe wie für Elektrolyte [HODSON und WIGHAM 1987]. Aus den oben angegebenen Werten für die Diffusionswiderstände für Elektrolyte geht hervor, dass der Diffusionswiderstand für Wasser innerhalb des Stromas im Vergleich zum Endothel gering und im Vergleich zum Epithel bedeutungslos ist.

Der Wasserhaushalt des Stromas ist, wie aus dem oben genannten Ausführungen hervorgeht, ein dynamisches Fließgleichgewicht. Von der Augenkammer diffundiert Wasser durch den hydrostatischen und osmotischen Druck angetrieben in das Stroma ein. Von der Tränenflüssigkeit wird der Fluss des Wassers nur durch osmotischen Druck angetrieben. Gleichzeitig wird zur Aufrechterhaltung einer konstanten Hydratisierung des Stromas Wasser durch aktive Prozesse wieder entfernt. Dieser Prozess erfolgt mit einer konstanten Kapazität an der Endothelseite und einer sympathisch gesteuerten Kapazität auf der Epithelseite.

Es ist zu vermuten, dass durch eine Erhöhung der Aktivität des Cl^- -Carriers

auf die dreifache Transportkapazität für Ionen durch DPE, damit im gleichen Ausmaß auch für die Wassermenge, eine deutliche Verschiebung dieses Fließgleichgewichtes erfolgt. Die über das Epithel verstärkt ausgeschiedene Wassermenge führt zu einer sich verstärkenden Hypertonie des Stromas. Das dadurch zunehmende Gefälle des osmotischen Drucks hat (auch als Ausgleich zum Erhalt des Hydratisierungsniveaus des Stromas) einen verstärkten passiven Einstrom von Wasser aus dem umliegenden Gewebe zur Folge. Die Unterschiede in den Diffusionswiderständen gegenüber Wasser (s. o.) von Endothel und Epithel bedingen, dass >75 % des Wassers durch den Einstrom aus dem Kammerwasser über das Endothel erfolgen müssen. Nicht eingerechnet ist hier der diesen Weg zusätzlich fördernde hydrostatische Druck in der Augenkammer.

In der Summe ergibt aus diesen Überlegungen sich ein gerichteter Wasserstrom vom Kammerwasser in die Tränenflüssigkeit durch die Applikation von DPE. Ein Modellversuch sollte die theoretischen Vorüberlegungen prüfen. Ein messbarer Strom von Wasser würde eine weitere Ausströmungsmöglichkeit für das Kammerwasser aus der Augenkammer neben den bestehenden Wegen beweisen, und damit zu einem Teilbetrag bei der Senkung des IOP werden.

8.3 Entwicklung einer Modellzelle

8.3.1 Anforderungen an die Zelle

Um messbare Effekte erzielen zu können, ist ein Druck notwendig, der deutlich höher als der IOP, auch als der pathologische IOP mit > 21 mm Hg ist. Ziel war eine Zelle, die im Niederdruckbereich bis 5 bar verwendbar ist. Das Donatorkompartiment musste eine ausreichende Befüllung zulassen, um über die zu erwartende Versuchsdauer von mehreren Stunden ohne Öffnung und damit ohne Druckwechsel auszukommen. Dieser Druckwechsel würde eine zusätzliche mechanische Belastung der Cornea bedeuten und musste deshalb auf ein Minimum reduziert werden. Besonderes Augenmerk war auf die Einspannvorrichtung für die Corneae zu legen. Das Gewebe durfte nicht durch Klemm- oder Schereffekte beschädigt werden. Dies galt insbesondere dann, wenn die mechanischen Belastungen durch den anliegenden Druck verstärkt wurden. Die Halterung war so

anzulegen, dass ein teilweises Verrutschen der Cornea verhindert wird. Die Auffangvorrichtung für das Wasser war so zu gestalten, dass dieses nicht verdunsten konnte.

8.3.2 Technische Beschreibung

Ein druckfester, kaskadierbarer Membran-Mikro-Reaktor aus der Abfallwirtschaft (s. Abb. 8.1) diente als Versuchszelle. Somit war eine Beaufschlagung des Donatorkompartiments mit geringen Drücken möglich. Zur Druckerzeugung ist im vorliegenden Fall entweder die Verwendung von Druckgasen oder die Erzeugung eines hydrostatischen Drucks praktikabel.

Der Durchmesser des Reaktorraums beträgt 10 mm, die verfügbare Membranfläche $0,78 \text{ cm}^2$. Die zwei Modulhälften des Reaktors bestehen aus Plexiglas und werden mit vier Schrauben (M4) druckfest gegeneinander verschraubt. Zur Abdichtung waren O-Ringe vorgesehen, deren Funktion für die vorliegenden Versuche durch eine Anpassung von Form und Größe auf die Fixierung der Cornea erweitert wurden.

Zum Erfassen des Flows von Wasser musste am Auslauf des Akzeptorkompartiments eine zusätzliche Vorrichtung zum Auffangen des Wassers angebracht werden, die eine Verdunstung des ausgetretenen Wassers auch über den Zeitraum von mehreren Stunden verhindern sollte. Gleichzeitig durfte die Auffangvorrichtung nicht dicht abschließen, um den Aufbau eines Gegendrucks am Auslauf der Zelle zu verhindern. Realisiert wurden diese Anforderungen durch ein Auffanggefäß mit dichtem Anschluss aus flexiblem Kunststoff am Auslaufrohr der Zelle und einer extrem kleinen Druckausgleichsöffnung ($\varnothing=0,5 \text{ mm}$), des Weiteren durch die Verwendung von saugfähigen Zellulosestoffen im Auffanggefäß, die durch kapillare Aufnahme und Chemisorption des anfallenden Wassers dessen Verdunstung zusätzlich stark behindern.

Der notwendige Druck wurde über ein Reduzierventil einem Druckgasbehälter (max. 200 bar) mit Carbogen-Gas entnommen und über handelsübliche Infusionsschlauchsysteme der Zelle zugeführt.

8.4 Versuchsdurchführung

Die entwickelte Druckzelle dient der Simulation des Kammerwasserdruckes auf die Cornea. Zum Erhalt von realisierbaren Analysenzeiten und messbaren Durchtrittsmengen wird mit einem im Vergleich zu den physiologischen Gegebenheiten stark gesteigerten Druck von 2 bar gearbeitet. Um einen erhöhten Ausstrom von Kammerwasser durch die Cornea zu simulieren, wurde die Perfusionsrichtung von endothelial nach epithelial festgelegt. Die Untersuchung der Fließgleichgewichte für das Wasser an den Übergängen Endothel, Stroma und Epithel im Einzelnen war nicht vorgesehen. Es sollte der Gesamtdurchlauf gemessen werden.

Mit Hilfe verschiedener Untersuchungslösungen (s. Tab. 8.1) sollte der Einfluss von DPE und ausgewählten Cyclodextrinen auf den Durchtritt von Wasser durch die Cornea untersucht werden.

Tabelle 8.1: Lösungen für die Inkubation der Corneae vor der Druckpermeation und zum Befüllen des Donatorkompartiments

Puffer pH 7,4
Puffer pH 7,4 mit $2,58 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ DPE
Puffer pH 7,4 mit $10,32 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ α -CD
Puffer pH 7,4 mit $10,32 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ β -CD
Puffer pH 7,4 mit $2,58 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ DPE und $10,32 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ α -CD
Puffer pH 7,4 mit $2,58 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ DPE und $10,32 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ β -CD

Für die Versuche wurden frische Rinder- bzw. Schweineaugen vom Schlachthof bezogen. Die Corneae wurden abpräpariert und 30 min in 10 ml der Untersuchungslösung bei 33 °C inkubiert, um in den Geweben, insbesondere dem Corneaepithel, die DPE-Konzentration zu erhöhen und durch den Einfluss der CD eine „Vorschädigung“ zu erzielen. Auch diffundieren in der Druckzelle DPE und die CD von der Endothelseite aus in das Gewebe ein; die dafür notwendige Zeitspanne bis zum Erreichen einer wirksamen Konzentration von DPE im Epithel sollte auf diese Weise vermieden werden, um die langen Versuchszeiten nicht weiter auszudehnen. Danach kamen die Corneae in die Haltevorrichtung der Zelle. Nach Verschließen der Zelle wurde das Donatorkompartiment mit derselben Un-

tersuchungslösung befüllt und ein Druck von $2,0 \pm 0,1$ bar über einen Zeitraum von 300 min angelegt. Die an der Epithelseite ausgetretene Wassermenge wurde aufgefangen und ihre Masse ermittelt.

8.5 Ergebnisse

Im Ergebnis dieser Versuche kam es zu einer deutlichen Veränderung der die Cornea passierenden Wassermenge. Dieses Resultat war sowohl beim Einsatz der Rinder- als auch beim Einsatz von Schweinecornea zu beobachten. In Tabelle 8.2 sind die Wassermengen, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Corneae passiert haben, zusammengefasst.

Tabelle 8.2: Ergebnisse des forcierten Wasserdurchtritts, Gesamtmenge nach 300 min in Abhängigkeit unterschiedlich zusammengesetzter Untersuchungslösungen; $\bar{x} \pm s$, $n=5$, $*p<0,05$ (Vergleich: Puffer)

eingesetzte Untersuchungslösung	Wassermenge [mg]	
	Rindercornea	Schweinecornea
Puffer	$31,4 \pm 5,6$	$67,5 \pm 10,2$
Puffer+ β -CD	$34,8 \pm 4,1$	$67,6 \pm 12,1$
Puffer+DPE	$59,5 \pm 5,8$ *	$144,7 \pm 17,4$ *
Puffer+DPE+ β -CD	$61,9 \pm 7,0$ *	$146,3 \pm 16,8$ *
Puffer+ α -CD	$191,7 \pm 165,4$	$47,5 \pm 5,5$
Puffer+DPE+ α -CD	$226,6 \pm 107,8$	$49,5 \pm 4,8$

Die Abbildungen 8.2 und 8.3 stellen die erhaltenen Werte graphisch dar. Die Ergebnisse zeigen den Wasserfluss unter den Versuchsbedingungen sowohl durch Rinder- als auch durch Schweinecornea. Dabei ist der Wert bei der Verwendung der Puffer-Untersuchungslösung für Schweinecornea etwa doppelt so groß wie beim Rind. Die erheblich größere Dicke der Rindercornea im Vergleich zu Schweinecornea könnte dieses Ergebnis hinreichend erklären. Eine Zugabe von β -CD zum Puffer hat offensichtlich keinerlei Auswirkungen auf die gemessene Wassermenge.

Anders sehen die Verhältnisse beim Einsatz von DPE aus. Bei beiden Spezies steigt der Flow etwa auf den doppelten Wert der gemessenen Ergebnisse bei den Versuchen mit Puffer. Eine gemeinsame Anwendung von DPE und β -CD ergibt dieselbe Durchtrittsmenge, wie bei der Anwendung von DPE allein.

Ein anderes Verhalten zeigte sich unter Einfluss von α -CD gefunden. Bei den Untersuchungen mit Rindercornea sprechen die Werte für eine extremen Steigerung des Wasserdurchflusses; der hohe Fehler weist aber auf starke individuelle Schwankungen hin, sodass sich, statistisch gesehen, kein signifikanter Unterschied zum Pufferwert errechnet.

Anders ist das Ergebnis bei den Schweinecorneae, die mit α -CD behandelt wurden. Hier kommt es scheinbar zu einer leichten Absenkung des Flows, die aber nicht signifikant ist. Eine Kombination mit DPE zeigt keine messbare Änderung der Resultate im Vergleich zu den Untersuchungswerten mit α -CD.

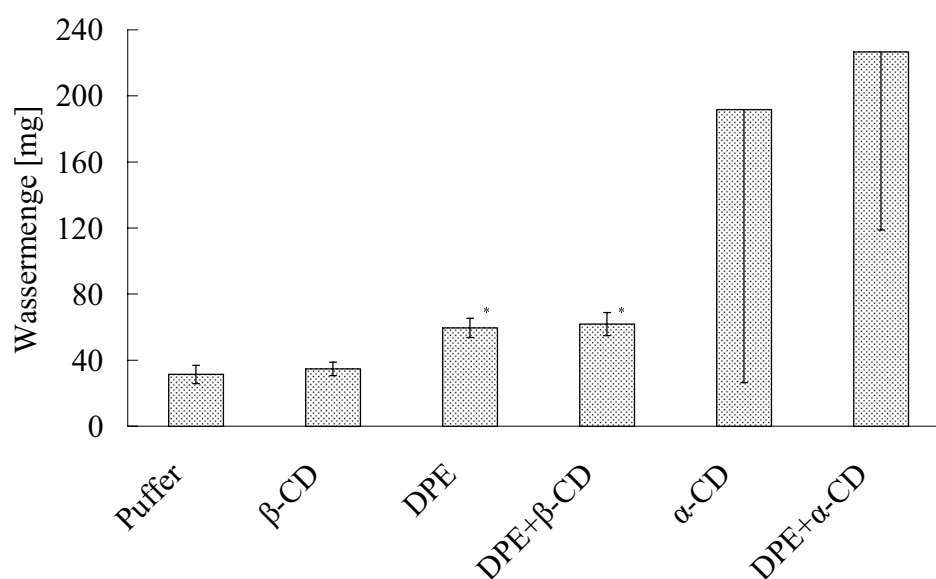


Abbildung 8.2: Ergebnisse des forcierten Wasserdurchtritts durch Rindercornea, Gesamtmenge nach 300 min in Abhängigkeit von unterschiedlich zusammengesetzten Untersuchungslösungen; $\bar{x} \pm s$, $n=5$, * $p<0,05$ (Vergleich: Puffer)

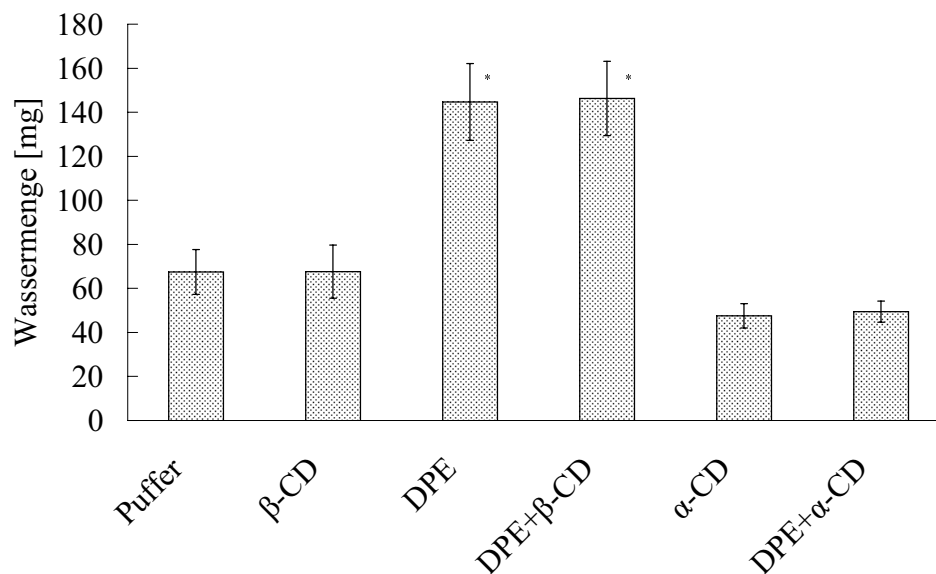


Abbildung 8.3: Zusammenstellung der Ergebnisse des forcierten Wasserdurchtritts durch Schweinecornea, Wassermenge nach 300 min in Abhängigkeit von unterschiedlich zusammengesetzten Untersuchungslösungen; $\bar{x} \pm s$, $n=5$, $*p<0,05$ (Vergleich: Puffer)

8.6 Diskussion

8.6.1 Modell-Theorie

Die Ergebnisse zeigen eine $\approx 100\%$ ige Steigerung des Volumenstroms an Wasser durch den Einsatz von DPE sowohl bei Rinder- als auch bei Schweinecornea. Damit scheint sich die Anfangsannahme einer Erhöhung des Wasserausstroms zu bestätigen.

Der Einfluss der Cyclodextrine auf den Volumenstrom des Wasser scheint hingegen vom Typ anhängig. β -CD beeinflusst weder bei Rinder- noch Schweinecornea den Flow. Die signifikante Erhöhung der Werte durch die Kombination DPE/ β -CD liegt in der Größenordnung der Werte der CD-freien Untersuchungslösung und dürfte insofern dem Arzneistoff zuzuordnen sein. Ganz anders der Einfluss des α -CD. Sowohl der extreme Anstieg des Volumenstroms beim Rind als auch die Verringerung beim Schwein haben vermutlich ihre Ursache in

der bekannten cornealen Toxizität (s. a. Kap. 3.4), die sich bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich bemerkbar macht. Während es beim Rind möglicherweise zu einer Auflockerung der die Diffusionsbarriere bildenden Zellschichten in unterschiedlichem Maße kommt und so ein hoher Volumenstrom resultiert, scheint sich das Zellgewebe beim Schwein zu verhärten, so dass es dem Wasserstrom einen erhöhten Widerstand entgegensetzt.

Der einzige Einflussfaktor, der zu einheitlichen und konstanten Ergebnissen führt, ist das DPE. Auf der Grundlage der Erhöhung des Volumenstroms \dot{V} soll im Folgenden ein vereinfachtes Volumenstrommodell erstellt werden.

$$\begin{aligned}\dot{V}_{Eingang} &= \dot{V}_{Ausgang} \\ (\text{Eingangsvolumenstrom} &= \text{Ausgangsvolumenstrom}) \\ \dot{V}_{Augenkammer} &= \dot{V}_{SchlemmKanal} + \dot{V}_{Rückdiffusion} + \dot{V}_{Uveo-skl.} \quad (8.1)\end{aligned}$$

Da die Versuche an Rinder- und Schweinecornea gezeigt haben, dass sie für proteinfreie Ultrafiltrate (s. Kap. 8.2) unter den Versuchsbedingungen bedingt durchlässig ($\dot{V}_{Cornea,Rind}=0,105 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$; $\dot{V}_{Cornea,Schwein}=0,225 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) und bei DPE ($\dot{V}_{Cornea,Rind,DPE}=0,198 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$; $\dot{V}_{Cornea,Schwein,DPE}=0,482 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) relativ gesehen sogar besonders durchlässig sind (Steigerung auf 200 % !), muss Gleichung 8.1 wie folgt erweitert werden.

$$\dot{V}_{Augenkammer} = \dot{V}_{SchlemmKanal} + \dot{V}_{Rückdiffusion} + \dot{V}_{Uveo-skl.} + \dot{V}_{Cornea} \quad (8.2)$$

Da aus Messungen am intakten menschlichen Auge der Volumenstrom in der Augenkammer mit $\dot{V}_{Augenkammer}=2 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ als konstante Eingangsgröße bekannt ist [THEWS et al. 1999], muss gemäß der Kontinuitätsgleichung (Gl. 8.3), d. h. Konstanthaltung der Eingangs- und Ausgangsvolumenströme, gelten, dass bei inkompressiblen Flüssigkeiten ebenfalls $2 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ aus der Augenkammer abfließen.

$$\dot{V} = A_1 \cdot w_1 = A_2 \cdot w_2 = konst. \quad (8.3)$$

mit	$\dot{V} = A \cdot w$
\dot{V} ...	Volumenstrom [$m^3 \cdot s^{-1}$]
A ...	Stömungsfläche [m^2]
w ...	mittlere Strömungsgeschwindigkeit [$m \cdot s^{-1}$]

Bedingt durch den diastolischen Druck der Kapillaren im Ziliarkörper kann der IOP nicht beliebig steigen, sondern nur bis zu dem Grenzwert, an dem der IOP auf dem Druckniveau der Kapillaren liegt. Trotz der Drucksteigerung fließt das Kammerwasser ab. Das setzt voraus, dass sich die partiellen Volumenströme ($\dot{V}_{SchlemmKanal}$, $\dot{V}_{Rückdiffusion}$, $\dot{V}_{Uveo-skl.}$, \dot{V}_{Cornea}) verändern. Da sich bei Druckänderungen die Zusammensetzung des als Ultrafiltrat entstehenden Kammerwassers nicht ändert, kann gemäß dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz (s. a. Kap. 7.2.4.2) der rückdiffusionsbedingte Volumenstrom ($\dot{V}_{Rückdiffusion}$) als konstant angesehen werden. Gleiches gilt in erster Näherung für den Volumenstrom über Drainagen ($\dot{V}_{Drainage}$), da er durch die vorhandenen Porendurchmesser (Röhren) bedingt ist. Durch das Einsetzen konstanter Werte vereinfacht sich Gleichung 8.2 in erster Näherung zu Gleichung 8.4.

$$\dot{V}_{Augenkammer} = \dot{V}_{SchlemmKanal} + \dot{V}_{Cornea} + \dot{V}_{konstant} \quad (8.4)$$

Somit kann bei den weiteren Betrachtungen unter der Prämisse, dass die partiellen Anteile (x, y, z) des Ausgangsvolumenstroms (ähnlich dem Molenbruch) gleich Eins zu setzen sind ($x + y + z = 1$), Gleichung 8.4 um die partiellen Anteile zu einem Volumenstrommodell erweitert werden (Gl. 8.5).

$$\dot{V}_{Augenkammer} = x \cdot \dot{V}_{SchlemmKanal} + y \cdot \dot{V}_{Cornea} + z \cdot \dot{V}_{konstant} \quad (8.5)$$

Geht man davon aus, dass am intakten Auge der Hauptteil des einfließenden Kammerwassers über den Schlemm'schen Kanal abfließt, so wird der Rest über

die Konstanten und, wie die Versuche gezeigt haben, z. T. über die Cornea abfließen. Als Beispiel (Gl. 8.6) seien hier folgende partielle Anteile gewählt: $x=0,8$; $y=0,1$ und $z=0,1$.

$$\dot{V}_{Augenkammer} = 0,8 \cdot \dot{V}_{SchlemmKanal} + 0,1 \cdot \dot{V}_{Cornea} + 0,1 \cdot \dot{V}_{konstant} \quad (8.6)$$

Da aus den Versuchen hervorgeht, dass durch den Einsatz von DPE (s. Kap. 8.5) das Durchflussvolumen der Cornea auf das Doppelte gesteigert werden kann, wird aus Gleichung 8.6 ersichtlich, dass der Kammerwasservolumen-Beiwert y bis auf 0,2 (20 %) ansteigen kann und unter den Modellvorgaben für die Startwerte von x , y und z somit eine fast 13 %-ige Verminderung des Volumenstroms am Schlemm'schen Kanal durch den cornealen Abfluss aufgefangen werden kann.

Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass die in-vitro-Versuche an präparierten Rinder- und Schweinecorneae modellhaften Charakter tragen und ihre Übertragung auf physiologische Bedingungen nicht unmittelbar möglich ist. Zum einen sind die angewendeten Labordrücke sehr hoch, zum anderen sind die weiteren positiven, d.h. filtrationsbeschleunigenden Effekte durch die hohen Drücke am intakten Gewebe nicht mehr vorhanden. So sind im Modell z. B. folgende Parameter verändert: Porenstruktur, mögliche Brückenbildungen, Temperatur-, Dichte- und dynamische Viskositätsbeeinflussungen sowie Autoregulationsprozesse (Öffnung von spannungs- und dehnungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen; lokaler Anstieg des CO_2 -Partialdrucks und der H^+ -Konzentration, die eine Erhöhung der AMP- und ADP-Konzentrationen bewirken und daher zur Vasodilatation führen). In diesem Zusammenhang sei auch auf die gute Filtrierbarkeit kleiner Teilchen, wie H_2O , Na^+ , Glucose und Harnstoff in Geweben (z. B. Niere) hinzuweisen.

8.6.2 Modell-Rechnung am Beispiel Schweinecornea

Für eine Modellrechnung ist die Verwendung der mit der Schweinecornea erhaltenen Werte den Ergebnissen der Rindercornea vorzuziehen, weil die Schweinecornea in Größe und Dicke der menschlichen Cornea wesentlich näher ist.

Der Volumenstrom aus Gefäßen (als Modell für den Bulbus) wird nach Gleichung 8.7 wie folgt berechnet:

$$\dot{V} = A\mu\sqrt{2gh} \quad (8.7)$$

\dot{V}	...	Volumenstrom [$m^3 \cdot s^{-1}$]
A	...	Ausströmfläche [m^2]
μ	...	Ausflusszahl (Reibungskennzahl an Kanten)
g	...	Fallbeschleunigung [$m \cdot s^{-2}$]
h	...	Druckhöhe [m]

Setzt man für die Druckhöhe $h = \frac{p}{\rho g}$ und stellt nach A um, erhält man eine Gleichung für die effektive Ausströmfläche (Gl. 8.8).

$$A = \frac{\dot{V}}{\mu \cdot \sqrt{2 \frac{p}{\rho}}} \quad (8.8)$$

p	...	Druck [Pa; $kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-2}$]
ρ	...	Dichte [$kg \cdot m^{-3}$]

Mit Hilfe der Gleichung 8.8 lässt sich unter Einsetzen der bekannten Werte eine effektive Ausströmfläche (als Summe der effektiven Ausströmflächen von Schlemm'schem Kanal, Rückdiffusion, uveo-skleralen Weg und der Cornea) für das Kammerwasser errechnen. Bekannt sind: der Volumenstrom (Kammerwasserbildung im menschlichen Auge) $\dot{V}=2\mu l \cdot min^{-1}$, der Druck (aus dem Bereich des normalen Augeninnendrucks) $p=15\text{ mm Hg}$ ($=2\text{ kPa}$), die Dichte (des Kammerwassers, im Modellversuch des Puffers) $\rho \approx 1\text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ und die Ausflusszahl (für rundliche Öffnungen) $\mu=0,97$.

Es lässt sich somit eine scheinbare effektive Ausströmfläche für das Kammerwasser am menschlichen Augen modellhaft berechnen. Sie beträgt $A=17,16\mu m^2$.

Diese effektive Ausströmfläche verringert sich beim Glaukom durch mechanische Behinderung des Abflusses bzw. Gewebsveränderungen in den Abflusswegen. Für einen beispielhaften pathologischen IOP von 40 mm Hg verringert sich A auf $10,51 \mu\text{m}^2$ als Ausdruck der pathologischen Veränderungen.

Wie aus Gleichung 8.7 hervorgeht, ist $\dot{V} \sim \sqrt{p}$. Damit lassen sich die Volumenströme durch die Cornea (\dot{V}_{Cornea}) bei normalem IOP (15 mm Hg) aus den experimentellen Werten (2 bar) errechnen. Der Volumenstrom ohne DPE-Einfluss beträgt demnach $\dot{V}_{\text{Cornea}}=0,0225 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Durch die Applikation von DPE steigt der Volumenstrom auf $\dot{V}_{\text{Cornea,DPE}}=0,0482 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Die korrespondierende effektive Ausströmfläche der Cornea beträgt demnach $A_{\text{Cornea}}=0,193 \mu\text{m}^2$ ohne bzw. $A_{\text{Cornea,DPE}}=0,414 \mu\text{m}^2$ unter DPE-Einfluss.

Um die Differenz von $A_{\text{Cornea,DPE}}-A_{\text{Cornea}}=0,221 \mu\text{m}^2$ erhöht sich die verfügbare effektive Ausströmfläche und führt damit zu einer Drucksenkung im Auge. Für das Modell lassen sich unter vereinfachenden Annahmen mit Hilfe von Gleichung 8.9 (aus Gl. 8.7) die resultierenden Drücke bei sich verändernden effektiven Ausströmflächen berechnen.

$$p = \frac{\rho}{2} \left(\frac{\dot{V}}{\mu A} \right)^2 \quad (8.9)$$

Vernachlässigt werden bei der Berechnung die Tatsachen, dass der Volumenstrom der Cornea abhängig ist von p ($\dot{V} \sim \sqrt{p}$), die Ausströmfläche der Cornea abhängig ist von \dot{V} und p ($A \sim \dot{V}$; $A \sim \sqrt{p}$) und das μ als Ausflusszahl von der Art der verschiedenen Gewebe und von ihrer strukturellen Veränderung abhängig sind. Während μ nur durch Untersuchungen der einzelnen Gewebe erfassbar wäre, ließen sich die beiden erstgenannten Parameter exakt für den zeitlichen Druckabfall ($\frac{dp}{dt}$) nach DPE-Applikation mit Hilfe eines Differenzial-Gleichungssystems errechnen. Wie sich aus den Ausführungen in Kap. 7.2.4 ergibt, müssten für eine exakte Berechnung neben dem Druck und der Zeit alle drei Raumdimensionen, ebenso die bisher vernachlässigte Viskosität und die Temperatur in das Gleichungssystem aufgenommen werden.

Als Konsequenz der Vereinfachung ergibt die Berechnung des Druckabfalls für einen fiktiven Glaukomfall mit einem IOP von 40 mm Hg (und einer effektiven

Ausströmfläche von $10,51 \mu\text{m}^2$, s. o.), dass durch die Zunahme der Ausströmfläche um $0,221 \mu\text{m}^2$ ein Absinken des IOP auf $\approx 38,5 \text{ mm Hg}$ erfolgt. Das entspricht in Bezug auf die Differenz zum Ziel-IOP (im mathematischen Modell 15 mm Hg) einem Anteil an der Drucksenkung von $\approx 6,1 \%$.

Ein aus den theoretischen Überlegungen abgeleiteter Ausstrom von Kammerwasser durch die Cornea, der durch DPE verstärkt wird, ließ sich im Modellversuch bestätigen. Die Umrechnung der Verhältnisse auf physiologische Drücke belegt unter den o. g. Einschränkungen, dass eine praxisrelevante Strömung von Wasser aus der Augenkammer durch die Cornea in die Tränenflüssigkeit theoretisch möglich ist.

Kapitel 9

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss ausgewählter Cyclodextrine auf die Esterspaltung von Dipivefrin im isolierten Epithel der Cornea und durch das Reinenzym Butyrylcholinesterase sowie mit den Wechselwirkungen der ausgewählten Cyclodextrine mit Dipivefrin in vitro und mit dem cornealen Gewebe. Der Einfluss der Cyclodextrine auf das Permeationsverhalten von Dipivefrin und der Einfluss von Cyclodextrinen und Dipivefrin auf die Permeation von Wasser durch die Cornea wurden modellhaft untersucht.

Folgende Cyclodextrine wurden in die Untersuchungen einbezogen: α -, β - und γ -Cyclodextrin und ihre jeweiligen hydroxypropylierten Derivate.

Enzymatische Untersuchungen Gegenstand dieser Studie war der enzymatische Abbau des Prodrugs Dipivefrin durch das stoffwechselaktive Corneaepithel. Als Ausgangsmaterial dienten isolierte Rinderaugen. Im Homogenat des Epithels und gleichermaßen unter dem Einfluss von Butyrylcholinesterase fand die enzymatische Spaltung von Dipivefrin statt und die Wirkform Epinephrin wurde quantifiziert.

Die Einflussnahme der getesteten Cyclodextrine auf die Esterhydrolyse zeigte sich in einer typ- und konzentrationsabhängigen Erhöhung bzw. Verminderung der Abbauraten von Dipivefrin. α - und HP- α -Cyclodextrin waren ohne Einfluss auf die hydrolytische Aktivität von Epithelhomogenat und Butyrylcholinesterase.

Demgegenüber führte der Einsatz von β - und HP- β -Cyclodextrin zu einer vergleichbaren, mit steigender Cyclodextrin-Konzentration zunehmenden starken Hemmung der Hydrolyse von Dipivefrin. Die Effekte im Epithelhomogenat waren wesentlich stärker ausgeprägt als bei Versuchen mit dem Reinenzym Butyrylcholinesterase. Diese Differenz erklärt sich möglicherweise mit dem Vorhandensein von unspezifischen Esterasen im Epithelhomogenat, deren Aktivität ebenfalls durch die Cyclodextrine beeinflussbar ist.

γ - und HP- γ -Cyclodextrin erhöhen in niedriger Konzentration die Hydrolyse-rate von Dipivefrin. Mit steigender Konzentration geht dieser Effekt im Epithelhomogenat verloren, bei der Butyrylcholinesterase kommt es zu einer Umkehr des Effektes mit steigender Konzentration.

Einen Einfluss auf die Hydrolyse von DPE durch die Hydroxypropylierung der Cyclodextrine konnte nicht gefunden werden; daher sind die gefundenen Reaktivitäten der jeweiligen CD-Kavität zuzuschreiben.

Wechselwirkungen der Cyclodextrine mit Dipivefrin Verschiedene Methoden zur Charakterisierung der Dipivefrin/Cyclodextrin-Wechselwirkung wurden angewandt. Dabei lag das Augenmerk auf dem direkten Nachweis einer Wechselwirkung in wässriger Lösung.

Mit keiner der verwendeten Methode war eine Wechselwirkung des Arzneistoffes mit α - bzw. HP- α -Cyclodextrin in wässriger Lösung nachweisbar.

β - und HP- β -Cyclodextrin zeigten mit den Verfahren Ultrafiltration, HPLC und UV-Spektroskopie eine Wechselwirkung mit Dipivefrin in wässriger Lösung. Mittels ^1H -NMR-Spektroskopie war eine Wechselwirkung zwischen Dipivefrin und HP- β -Cyclodextrin in DMSO nachweisbar (weitere CD nicht geprüft).

Für γ - und HP- γ -Cyclodextrin ist aus dem chromatographischen und dem UV-spektroskopischen Analysenverfahren ebenfalls eine, wenn auch nur schwache Wechselwirkung mit DPE zu schließen.

Wechselwirkungen der Cyclodextrine mit dem cornealen Gewebe Die Wechselwirkungen mit dem cornealen Gewebe wurden exemplarisch an α - und β -Cyclodextrin untersucht. Elektronenmikroskopisch konnte eine Veränderung der

Stroma-Struktur durch die Cyclodextrine beobachtet werden, die durch die Kombination mit Dipivefrin verstärkt wurde. DPE allein oder die Behandlung mit dem Puffermedium verursachten diese Veränderungen nicht.

Mittels thermoanalytischer Untersuchungen konnte eine reversible Wechselwirkung zwischen β -Cyclodextrin und cornealem Gewebe nachgewiesen werden. Bei α -Cyclodextrin erwiesen sich die Wechselwirkungen als nicht reversibel.

Eine Quantifizierung der Einflussnahme der Cyclodextrine auf das corneale Gewebe ist nach diesen Untersuchungen nicht möglich. Die vorliegende Feststellung der Wechselwirkung mit dem cornealem Gewebe macht keine Aussage darüber, ob sich in vivo physiologisch messbare und relevante Effekte ergeben würden.

Permeationsbeeinflussung durch Cyclodextrine Die Cyclodextrine nehmen z. T. auf Grund ihrer Wechselwirkung mit Dipivefrin und/oder mit dem cornealen Gewebe einen messbaren und signifikanten Einfluss auf die Permeation von Dipivefrin durch Schweinecornea.

Aus den enzymatischen Versuchen ist abzuleiten, dass die Cyclodextrine während des Verlaufs der Permeation z. T. auch die gleichzeitig im Corneaepithel stattfindende Metabolisierung von Dipivefrin beeinflussen können.

α -Cyclodextrin verursacht einen schnellen Durchtritt (auf Grund der bekannten cornealen „Toxizität“ des α -CD) von Dipivefrin durch die Cornea, ohne dabei auf die enzymatische Hydrolyse von Dipivefrin zu Epinephrin messbaren Einfluss zu nehmen.

γ -Cyclodextrin bedingt durch seine Wechselwirkung mit Dipivefrin eine Verringerung der Permeationsrate von Dipivefrin. Die Hydrolyserate von Dipivefrin wird dabei erheblich gesteigert — was als Folge niedriger Konzentrationen in den stoffwechselaktiven Epithelzellen, analog zu den enzymatischen Versuchen, zu sehen ist.

HP- β -CD vermag schon in niedrigen Konzentrationen durch seine ausgeprägte Wechselwirkung mit Dipivefrin dessen Permeation nachhaltig zu vermindern. Die

in den enzymatischen Versuchen festgestellte verringerte Hydrolyse von DPE durch HP- β -CD macht sich in den Permeationsuntersuchungen nicht bemerkbar.

Auf Grund seiner guten Verträglichkeit am Auge könnte der Einsatz von HP- β -Cyclodextrin in dipivefrinhaltigen Ophthalmika für die Erzielung eines retardierenden Effektes diskutiert werden.

Forcierte Permeation von Wasser durch die Cornea Die Permeation von Wasser von endothelial nach epithelial, d. h. aus dem Inneren des Auges heraus, durch eine Verschiebung des dynamischen Fließgleichgewichtes des Wasserhaushaltes im Stroma, verursacht durch Dipivefrin, war unter den Modellbedingungen mit erhöhtem Druck sowohl für Rinder- als auch für Schweinecornea nachweisbar. Dabei kam es jeweils zu einer Steigerung des Volumenstroms von Wasser in der Größenordnung von 100 % gegenüber Pufferlösung.

Ein Einfluss von α - und β -Cyclodextrin auf die forcierte Permeation von Wasser konnte nicht nachgewiesen werden.

In der Umrechnung der Modelldaten auf physiologische Drücke kommt es zu praxisrelevanten Volumenströmen von Kammerwasser, die die Augenkammer über die Cornea, also auf unkonventionelle Wege verlassen könnten. Aus den Modelldaten errechnet sich für den cornealen Weg des Kammerwasserausstroms ein Beitrag an der Senkung des intraokularen Drucks nach Applikation von Dipivefrin als Antiglaukomatosum.

Auf Grund der notwendigen hohen Drücke zum Erreichen eines messbaren Volumenstroms ist eine eindeutige Beurteilung des gefundenen Effektes noch nicht möglich. Für weitere Untersuchungen ist eine Reduzierung der Drücke, nach Möglichkeit bis in den physiologischen Bereich hinab, notwendig. Die zu erwartenden geringen Volumenströme stellen dabei sehr hohe Anforderungen an die Analytik. Mit der bereits für die Messung der Diffusion von Arzneistoffen direkt im Gewebe verwendeten konfokalen Lasermikroskopie oder dem Einsatz von radioaktiv markiertem Wasser stehen möglicherweise die geeignete Verfahren hierfür zur Verfügung.

Literaturverzeichnis

- [ABRAHAM et al. 1987] ABRAHAM, N. G., J. H. LIN, M. W. DUNN und M. L. SCHWARTZMAN (1987). *Presence of heme oxygenase and NADPH cytochrome P-450 (c) reductase in human corneal epithelium*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 28(9):1464–1472.
- [AHMAD et al. 1988] AHMAD, H., S. V. SINGH, R. D. MEDH, G. A. ANSARI, A. KUROSKY und Y. C. AWASTHI (1988). *Differential expression of alpha, mu and pi classes of isozymes of glutathione S-transferase in bovine lens, cornea, and retina*. Arch. Biochem. Biophys., 266(2):416–426.
- [ALBRECHT 1999] ALBRECHT, R. (1999). *Projektarbeit: Konstruktion (CAD) eines Membran-Mikro-Reaktors*. Fachhochschule für Technik, Wirtschaft und Gestaltung, Wismar.
- [AMICON, INC. 1995] AMICON, INC. (1995). *Katalog: Ultrafiltration - Chromatographie*. Massachusetts, USA.
- [ANDERSON et al. 1980] ANDERSON, J. A., W. L. DAVIS und C. P. WEI (1980). *Site of ocular hydrolysis of a prodrug, dipivefrin, and a comparison of its ocular metabolism with that of the parent compound, epinephrine*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 19(7):817–823.
- [ASHANI et al. 1972] ASHANI, Y., P. WINS und I. B. WILSON (1972). *The inhibition of cholinesterase by diethyl phosphorochloridate*. Biochim. Biophys. Acta, 284(2):427–434.
- [AUGUSTINSSON 1960] AUGUSTINSSON, K. (1960). *The Enzymes IV*, Kap. Butyryl- and propionylcholinesterases and related types of serine-sensitive esterases, S. 521. Academic Press, New York.

- [AUGUSTINSSON und ERICKSSON 1974] AUGUSTINSSON, K. B. und H. ERICKSSON (1974). *The effect of two disulphides on cholinesterase activity in the spectrophotometric assay*. Biochem. J., 139(1):123–127.
- [BAUM und WARD 1971] BAUM, G. und F. WARD (1971). *General enzyme studies with a substrate-selective electrode: characterisation of cholinesterase*. Anal. Biochem., 42(2):487.
- [BAUSHER und SEARS 1976] BAUSHER, L. P. und M. L. SEARS (1976). *Potential of the effects of topical epinephrine on the pupil and intraocular pressure in the sympathetically denervated rabbit eye by a catechol-O-methyl transferase inhibitor*. Invest. Ophthalmol., 15(10):854–857.
- [BECK und LANGEHAGE 1995] BECK, T. und P. LANGEHAGE (1995). *Auge und visuelles System*. PZ, 140(51/52):52–64.
- [BENEDETTI et al. 1988] BENEDETTI, M. S., P. DOSTERT und K. F. TIPTON (1988). *Contributions of monoamine oxidase to the metabolism of xenobiotics*. In: GIBSON, G. G., Hrsg.: *Progress in drug metabolism, Vol. 11*, S. 149–173. Taylor and Francis, London.
- [BENTLEY et al. 1997] BENTLEY, M. V. L. B., R. F. VIANNA, S. WILSON und J. H. COLLETT (1997). *Characterisation of the influence of some cyclodextrins on the stratum corneum from hairless mouse*. J. Pharm. Pharmacol., 49(4):397–402.
- [BERMAN 1978] BERMAN, M. B. (1978). *Regulation of collagenase. Therapeutic considerations*. Trans. Ophthalmol. Soc. UK, 98(3):397–405.
- [BISRAT et al. 1990] BISRAT, M., C. NYSTÖM und P. EDMAN (1990). *Influence of dissolution rate of sparingly soluble drugs on corneal permeability in vitro*. Int. J Pharm., 63:49–56.
- [BLOCH et al. 1946] BLOCH, F., W. W. HANSEN und M. PACKARD (1946). *Nuclear induction*. Phys. Rev., 69:127–127.
- [BODOR und PROKAI 1990] BODOR, N. und L. PROKAI (1990). *Site- and stereospecific ocular drug delivery by sequential enzymatic bioactivation*. Pharm. Res., 7(7):723–725.

- [BODOR und VISOR 1984] BODOR, N. und N. VISOR (1984). *Formation of adrenaline in the iris-ciliary body from adrenalone diesters*. Exp. Eye Res., 38(6):621–626.
- [BRITTAİN 1993] BRITTAİN, H. G., Hrsg. (1993). *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, Bd. 22, Kap. Dipivefrin Hydrochlorid, S. 229–262. Academic Press, Inc., San Diego.
- [BROWNSON und WATTS 1973a] BROWNSON, C. und D. WATTS (1973a). *Interaction between 5',6'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) and cholinesterase complicating the coupled assay*. Biochim. Soc. Trans., 1:200.
- [BROWNSON und WATTS 1973b] BROWNSON, C. und D. WATTS (1973b). *The modification of cholinesterase activity by 5,6'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) included in the coupled spectrophotometric assay. Evidence for a non-catalytic substrate-binding site*. Biochem. J., 131(2):369–374.
- [BRUNNER und GENSTHALER 2002] BRUNNER, U. und B. M. GENSTHALER (2002). *Neu auf dem Markt: Anakinra, Bimatoprost und Fondaparinux Natrium*. PZ, 147(18):24–25.
- [BUNDGAARD et al. 1986] BUNDGAARD, H., E. FALCH, C. LARSEN, G. L. MOSHER und T. J. MIKKELSON (1986). *Pilocarpine prodrugs. II. Synthesis, stability, bioconversion, and physicochemical properties of sequentially labile pilocarpine acid diesters*. J. Pharm. Sci., 75(8):775–783.
- [BUSCHMAN et al. 1998] BUSCHMAN, H. J., U. DENTER und D. KNITTEL (1998). *The use of cyclodextrins in textile processes - An overview, Part 1*. J. Text. Inst., 89(3):554–561.
- [CAMBER 1985] CAMBER, O. (1985). *An in vitro model for determination of drug permeability through the cornea*. Acta Pharm. Suec., 22(6):335–342.
- [CAMPBELL et al. 1991] CAMPBELL, D. A., R. D. SCHOENWALD, M. W. DUFEL und C. F. BARFKNECHT (1991). *Characterization of arylamine acetyltransferase in the rabbit eye*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 32(8):2190–2200.

- [CAMPION und OLSEN 1974] CAMPION, D. S. und R. OLSEN (1974). *Measurement of drug displacement by continous ultrafiltration.* J. Pharm. Sci., 63(2):249–252.
- [CARDINALI und ROSNER 1972] CARDINALI, D. P. und J. M. ROSNER (1972). *Ocular distribution of hydroxyindole O-methyltransferase.* Gen. Comp. Endocrinol., 18:407–409.
- [CHIN et al. 1968] CHIN, T. F., P. H. CHUNG und J. L. LACH (1968). *Influence of cyclodextrins on ester hydrolysis..* J. Pharm. Sci., 57(1):44–48.
- [CHIU et al. 1972] CHIU, Y. C., R. K. TRIPATHI und R. D. O'BRIEN (1972). *Differences in reactivity of four butyrylcholinesterase isoenzyms towards substrate and inhibitors.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 46(1):35–42.
- [CHRAI und ROBINSON 1976] CHRAI, S. S. und J. R. ROBINSON (1976). *Binding of sulfisoxazole to protein fractions of tears.* J. Pharm. Sci., 65(3):437–439.
- [COUPLAND et al. 1993a] COUPLAND, S. E., H. HEIMANN, F. HOFFMANN, P. L. PENFOLD und F. A. BILLSON (1993a). *Increased hydrolase activities in the human trabecular meshwork of glaucomatous eyes.* Ger. J. Ophthalmol., 2(2):107–112.
- [COUPLAND et al. 1993b] COUPLAND, S. E., P. L. PENFOLD und F. A. BILLSON (1993b). *Histochemical survey of the anterior segment of the normal human foetal and adult eye.* Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 231(9):533–540.
- [COUPLAND et al. 1994] COUPLAND, S. E., P. L. PENFOLD und F. A. BILLSON (1994). *Hydrolases of anterior segment tissue in the normal human, pig and rat eye: a comperative study.* Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 232(3):182–191.
- [DAS und SHICHI 1981] DAS, N. D. und H. SHICHI (1981). *Enzymes of mercapturate synthesis and other drug-metabolizing reactions-specific localization in the eye.* Exp. Eye Res., 33(5):525–533.

- [DAVID et al. 2002] DAVID, M., F. A. DUNN und M. TAKAO (2002). *Photo-transduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock*. Science, 295(5557):1070–1073.
- [DIETZ et al. 1973] DIETZ, A. A., H. M. RUBINSTEIN und T. LUBRANO (1973). *Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propyonylthiocholin-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure*. Clin. Chem., 19(11):1309–1313.
- [DIN 1983] DIN (1983). *DIN 51005 Thermische Analyse (TA)*. DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin.
- [DIN 1994] DIN (1994). *DIN 51007 Differenzthermoanalyse (DTA)*. DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin.
- [DOBOWSKI und SYBILSKA 1982] DOBOWSKI, J. und D. SYBILSKA (1982). *β -cyclodextrin as a chiral component of the mobil phase for separation of mandelic acid into enantiomers in reversed-phase systems of high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr., 237:303.
- [DOBOWSKI et al. 1982] DOBOWSKI, J., D. SYBILSKA und J. JURACZAK (1982). *The resolution of some chiral compounds in reverse-phase high-performance chromatography by means of β -cyclodextrin inclusion complex*. Chromatographia, 16:198.
- [DOUGHTY 1996] DOUGHTY, M. J. (1996). *Assesment of variability in some lysosomal and soluble enzyme activity in corneal epithelium from slaughterhouse bovine eyes*. Ophthal. Res., 28(3):141–146.
- [EISENBURGER et al. 1981] EISENBURGER, R., H. HAMPEL, G. HOFRICHTER und R. LOSER (1981). *Comparative pharmacological study of d,1-adrenaline dipivalate hydrochloride and 1-adrenaline hydrochloride after local and oral administration*. Arzneimittelforschung, 31(2):325–334.
- [ELLIN 1972] ELLIN, R. I. (1972). *Cholinesterase determination (cont.)*. Clin. Chem., 18(5):487.
- [ELLIS et al. 1972] ELLIS, P. P., K. LITTLEJOHN und R. A. DEITRICH (1972). *Enzymatic hydrolysis of pilocarpine*. Invest. Ophthalmol., 11(9):747–751.

- [ENSINK und VAN HAERINGEN 1977] ENSINK, F. T. E. und N. J. VAN HAERINGEN (1977). *Pitfalls in the assay of lysozyme in human tear fluid*. Ophthalmic Res., 9:366–373.
- [EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH 3. AUSGABE 1997 1997] EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH 3. AUSGABE 1997 (1997). *Amtliche Deutsche Ausgabe*. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart und Govi Verlag - Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn.
- [EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH 3. AUSGABE 1997, NACHTRAG 2002] EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH 3. AUSGABE 1997, NACHTRAG (2002). *Amtliche Deutsche Ausgabe*. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart und Govi Verlag - Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn.
- [FIEDLER 1996] FIEDLER, H. P. (1996). *Lexikon der Hilfsstoffe*. Editio Cantor Verlag, Aulendorf, 4 Aufl.
- [FISCHBARG et al. 1985] FISCHBARG, J, J. HERNANDEZ, L. S. LIEBOVITCH und J. P. KONIAREK (1985). *The mechanism of fluid and electrolyte transport across corneal endothelium: critical revision and update of a model*. Corr. Eye Res., 4(4):351–360.
- [FORD et al. 1996] FORD, W., D. HENTSCHLER und W. RUMMEL (1996). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban und Fischer, München, 7. Aufl.
- [FRANKE 1998] FRANKE, P. (1998). *Vitamin D₃-Analogon/ β -Cyclodextrin-Kavitate — Herstellung, Charakterisierung und In-vitro-Liberation aus Dermatika*. Doktorarbeit, Humboldt-Universität, Berlin.
- [FREEDMAN et al. 1993] FREEDMAN, K. A., J. W. KLEIN und C. E. CROSON. (1993). *Beta-Cyclodextrins enhance bioavailability of pilocarpine*. Curr. Eye Res., 12(7):641–647.
- [FRENCH und RUNDLE 1942] FRENCH, D. und R. E. RUNDLE (1942). *The molecular weights of the schardinger alpha and beta dextrins*. J. Am. Chem. Soc., 64:1651–1653.

- [FREUDENBERG und CRAMER 1948] FREUDENBERG, K. und F. CRAMER (1948). *Die Konstitution der Schardinger Dextrine alpha, beta und gamma*. Z. Naturforscher, 3b:739–742.
- [FREUDENBERG und MAYER-DELIUS 1938] FREUDENBERG, K. und M. MAYER-DELIUS (1938). *Über die Schardinger Dextrine aus Stärke*. Ber. Deutsch. Chem. Ges., 71:1596–1600.
- [GARRY 1971] GARRY, P. J. (1971). *A manual and automated procedure for measuring serum cholinesterase activity and identifying enzyme variants. Differentiation by means of tris and phosphate buffers*. Clin. Chem., 17(3):192–198.
- [GAUDET und CHADER 1992] GAUDET, S. J. und G. J. CHADER (1992). *Partial purification and characterization of arylamine N-acetyltransferase in bovine retina*. Curr. Eye Res., 11(12):1185–1192.
- [GAWIENOWSKI et al. 1982] GAWIENOWSKI, A. M., D. CHATTERJEE, P. J. ANDERSON, D. L. EPSTEIN und W. M. GRANT (1982). *Effect of delta 9-tetrahydrocannabinol on monoamine oxidase activity in bovine eye tissues, in vitro*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 22(4):482–485.
- [GOLDBERG et al. 1980] GOLDBERG, I., A. E. KOLKER, M. A. KAS und B. BECKER (1980). *Dipivefrin: current concepts*. Aust. J. Ophthalmol., 8(2):147–150.
- [GONDHOWIARDJO et al. 1991] GONDHOWIARDJO, T. D., N. J. VAN HAERINGEN, R. H. L. PELS und A. KIJLSTRA (1991). *Detection of aldehyde dehydrogenase activity in human corneal extracts*. Curr. Eye Res., 10(11):1001–1007.
- [GREEN 1991] GREEN, K. (1991). *Corneal endothelial structure and function under normal and toxic conditions*. Cell Biol. Rev., 25(3):169–207.
- [GRÖGER et al. 2001] GRÖGER, M., E. K. KRETZER und A. WOYKE (2001). *Reader mit Hintergrundinformationen zum Thema: Cyclodextrine*. Science Forum der Universität Siegen, Siegen.

- [GRUBIC et al. 1975] GRUBIC, Z., J. SKETELJ und M. BRZIN (1975). *Notes on the thin-layer chromatography radiometric assay of cholinesterase activity*. Anal. Biochem., 69(1):306–309.
- [HAGERS HANDBUCH DER PHARMAZEUTISCHEN PRAXIS 1993] HAGERS HANDBUCH DER PHARMAZEUTISCHEN PRAXIS (1993). *Hrsg.: F. von Bruchhausen, S. Ebel, A. W. Frahm und E. Hackenthal*, Bd. 7 Stoffe A–D. Springer Verlag, Berlin, 5. Aufl.
- [HAMMOND et al. 1980] HAMMOND, G. L., J. A. NISKER, L. A. JONES und P. SITERI (1980). *Estimation of the percentage of free steroid in undiluted serum by centrifugal ultrafiltrations-dialysis*. J. Biol. Chem., 255(11):5023–5026.
- [HANKE 1993] HANKE, B. (1993). *Untersuchung zur Einschlußverbindung zwischen Pilocarpin und Cyclodextrinen in wässriger Lösung*. Diplomarbeit, Humboldt-Universität, Berlin.
- [HANKIEWICZ und SWIERCZEK 1974] HANKIEWICZ, J. und E. SWIERCZEK (1974). *Lysozyme in human body fluids*. Clin. Chim. Acta, 57(3):205–209.
- [HANSS und REY 1971] HANSS, M. und A. REY (1971). *Application de la Conductometrie a l'etude des reactions enzymatiques [Use of conductometry in the study of enzymic reactions. Butyrylcholinesterase]*. Biochim. Biophys. Acta, 227(3):618–629.
- [HART 1992] HART, W. M. (1992). *Adler's Physiology of the Eye*, Kap. Effect of preservatives, S. 64. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 9 Aufl.
- [HATTAR et al. 2002] HATTAR, S., H.-W. LIAO, M. TAKAO, D. M. BERSON und K. W. YAU (2002). *Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity*. Science, 295(5557):1065–1070.
- [HAYASAKA 1974] HAYASAKA, S. (1974). *Distribution of lysosomal enzymes in the bovine eye*. Jap. J. Ophthalmol., 18:233.
- [HAYASAKA 1983] HAYASAKA, S. (1983). *Lysosomal enzymes in ocular tissues and diseases*. Surv. Ophthalmol., 27(4):245–258.

- [HOCKWIN 1985a] HOCKWIN, O., Hrsg. (1985a). *Biochemie des Auges. Bücherei des Augenarztes*, Kap. Biochemie des Auges. 107. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- [HOCKWIN 1985b] HOCKWIN, O., Hrsg. (1985b). *Biochemie des Auges. Bücherei des Augenarztes*, Kap. Hornhaut und Bindehaut. 107. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- [HODSON und WIGHAM 1987] HODSON, S. A. und C. G. WIGHAM (1987). *Paracellular ionic and transcellular water diffusions across rabbit corneal endothelium*. J. Physiol., 385:89–96.
- [HUANG et al. 1983] HUANG, H. S., R. D. SCHOENWALD und J. L. LACH (1983). *Corneal penetration behavior of β -blocking agents II: Assessment of barrier contributions*. J. Pharm. Sci., 72(11):1272–1279.
- [HUBEL 1989] HUBEL, D. H. (1989). *Auge und Gehirn: Neurobiologie des Sehens*. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg.
- [INNEMEE und VAN ZWIETEN 1982] INNEMEE, H. C. und P. A. VAN ZWIETEN (1982). *The role of beta 2-adrenoceptors in the IOP-lowering effect of adrenaline*. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 218(6):297–300.
- [JANSEN et al. 1990] JANSEN, T., B. XHONNEUX, B. MESENS und J. BORGERS (1990). *β -cyclodextrins as vehicles in eye drop formulations: An evaluation of their effects on rabbit corneal epithelium*. Lens Eye Toxic Res., 7(3–4):459–468.
- [JARHO et al. 1997] JARHO, P., K. JÄRVINEN, K. URTTI, A. STELLA und V. J. JÄRVINEN (1997). *The use of cyclodextrins in ophthalmic formulations of dipivefrin*. Int. J. Pharm., 153:225–233.
- [JERKUNICA et al. 1980] JERKUNICA, I., J. SOPHIANOPOULOS und D. SGOUTAS (1980). *Improved ultrafiltration method for determining unbound cortisol in plasma*. Clin. Chem., 26(12):1734–1737.
- [JONES und PARR 1985] JONES, S. P. und G. D. PARR (1985). *Study of the inclusion complexation of barbitone and β -cyclodextrin using the filtration cell*. J. Pharm. Pharmacol., 37:109.

- [KABACK et al. 1976] KABACK, M. B., S. M. PODOS, T. S. HARBIN JR., A. MANDELL und B. BECKER (1976). *The effects of dipivalyl epinephrine on the eye*. Am. J. Ophthalmol., 81(6):768–772.
- [KAMARIC 1975] KAMARIC, L. M. (1975). *The inhibition by D-tubocurarine of horse serum cholinesterase-catalyzed hydrolysis of butyrylcholine and benzoylcholine*. Biochem. Pharmacol., 24(18):1663–1664.
- [KANAI et al. 1989] KANAI, A., R. M. ALBA, T. T. AN C. KOBAYASHI, A. NAKAJIMA, K. KURIHARA, T. YOKOHAMA und M. FUKAMI (1989). *The effect on the cornea of α -cyclodextrin vehicle for cyclosporin eye drops*. Transplant. Proc., 21(1 Pt 3):3150–3152.
- [KASS 1979] KASS, M. A. (1979). *Dipivefrin and epinephrine treatment of elevated intraocular pressure: a comparative study*. Arch. Ophthalmol., 97(10):1865–1866.
- [KAWA et al. 1993] KAWA, J. E., E. J. HIGGINBOTHAM, I. L. CHANG und B. Y. J. T. YUE (1993). *Effects of antiglaucoma medications on bovine trabecular meshwork cells in vitro*. Exp. Eye Res., 57(5):557–565.
- [KEIPERT et al. 1996] KEIPERT, S., J. FEDDER, A. BÖHM und B. HANKE (1996). *Interactions between cyclodextrins and pilocarpine as an example of a hydropilic drug*. Int J. Pharm., 142:153–162.
- [KEIPERT und VOIGT 1975] KEIPERT, S. und R. VOIGT (1975). *Wechselwirkungen zwischen makromolekularen Hilfsstoffen und Arzneistoffen. 1. Mitteilung: Assoziationstendenzen zwischen Polyvinylalkohol und Lokalanaesthetica*. Pharmazie, 30:589–590.
- [KLEEMAN und ENGEL 1982] KLEEMAN, V. A. und J. ENGEL (1982). *Pharmazeutische Wirkstoffe*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- [KLYCE und CROSSON 1985] KLYCE, S. D. und C. E. CROSSON (1985). *Transport processes across the rabbit corneal epithelium: a review*. Curr. Eye Res., 4(4):323–330.

- [KLYCE et al. 1973] KLYCE, S. D., A. H. NEUFELD und J. A. ZADUNAISKY (1973). *The activation of chloride transport by epinephrine and DB cyclic-AMP in the cornea of the rabbit*. Invest. Ophthalmol., 12(2):127–139.
- [KLYCE und WONG 1977] KLYCE, S. D. und R. K. S. WONG (1977). *Site and mode of adrenalin action on chloride transport across the rabbit corneal epithelium*. J. Physiol., 266(3):407–429.
- [KNORRE 1981] KNORRE, W. A. (1981). *Pharmakokinetik*. Akademie-Verlag, Berlin.
- [KOELLE et al. 1974] KOELLE, G. B., R. DAVIS, E. J. JR. DILIBERTO und W. A. KOELLE (1974). *Selective, near-total inactivation of peripheral pseudocholinesterase and acetylcholinesterase in cats in vivo*. Biochem Pharm., 23(2):175–188.
- [KRISHNA et al. 1961] KRISHNA, N., M. J. MANN und I. H. LEOPOLD (1961). *Manometric determination of monoamin oxidase in ocular tissue*. Arch. Ophthalmol., 65:338–340.
- [KUMAR et al. 1993a] KUMAR, G. N., R. H. HAMMER und N. S. BODOR (1993a). *Soft drugs. 12: Design, syntheses and evaluation of soft anticholinergics*. Drug. Des. Discov., 10(1):11–21.
- [KUMAR et al. 1993b] KUMAR, G. N., R. H. HAMMER, W. M. WU und N. S. BODOR (1993b). *Soft drugs 15: mydriatic activity and transcorneal penetration of phenylsuccinic soft analogs of methscopolamine as short acting mydriatics*. Curr. Eye Res., 12(6):501–506.
- [KWONG 1985] KWONG, T. C. (1985). *Free drug measurements: Methodology and clinical significance*. Clin. Chim. Acta, 151(3):193–216.
- [LEE und HARPST 1973] LEE, J. C. und J. A. HARPST (1973). *Physical properties and subunit structure of butyrylcholinesterase from Horse serum*. Biochemistry, 12(8):1622–1630.
- [LEE 1983] LEE, V. H. L. (1983). *Esterase activities in adult rabbit eyes*. J. Pharm. Sci., 72(3):239–244.

- [LEE et al. 1985] LEE, V. H. L., S. C. CHANG, C. M. OSHIRO und R. E. SMITH (1985). *Ocular esterase composition in albino and pigmented rabbits: possible implications in ocular prodrug design and evaluation*. Curr. Eye Res., 4(11):1117–1125.
- [LEE et al. 1988] LEE, V. H. L., D. S. CHIEN und H. J. SASAKI (1988). *Ocular ketone reductase distribution and its role in the metabolism of ocularly applied levobunolol in the pigmented rabbit*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 246(3):871–878.
- [LEE et al. 1982-83] LEE, V. H. L., D. S. IIMOTO und K. A. TAKEMOTO (1982-83). *Subcellular distribution of esterases in the bovine eye*. Curr. Eye Res., 2(12):869–876.
- [LEE et al. 1982] LEE, V. H. L., K. W. MORIMOTO und R. E. STRATFORD JR. (1982). *Esterase distribution in the rabbit cornea and its implications in ocular drug bioavailability*. Biopharm. Drug Dispos., 3(4):291.
- [LEUTHARDT 1959] LEUTHARDT, F. (1959). *Lehrbuch der Physiologischen Chemie*. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- [LIN und YANG 1987] LIN, S.-Y. und J.-C. YANG (1987). *The effect of cyclodextrin inclusion complexation on the in vitro protein binding and in vivo prothrombin time of warfarin*. Drug Dev. Int. Pharm., 13:329–343.
- [LOFTSSON und JÄRVINEN 1999] LOFTSSON, T. und T. JÄRVINEN (1999). *Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev., 36:59–79.
- [LOFTSSON und SIGURDARDOTTIR 1994] LOFTSSON, T. und A. M. SIGURDARDOTTIR (1994). *The effect of polyvinylpyrrolidone and hydroxypropyl methylcellulose on HP-beta-CD complexation of hydrocortisone and its permeability through hairless mouse skin*. Eur. J. Pharm. Sci., 2(4):297–301.
- [MACGREGOR und SARDI 1991] MACGREGOR, T. R. und E. D. SARDI (1991). *In vitro protein binding behavior of dipyridamole*. J. Pharm. Sci., 80(2):119–120.
- [MAIN et al. 1974] MAIN, A., W. SOUCIE, I. BUXTON und E. ARINC (1974). *The purification of cholinesterase from horse serum*. Biochem. J., 143(3):733–744.

- [MARSHALL und KLYCE 1983] MARSHALL, W. S. und S. D. KLYCE (1983). *Cellular and paracellular pathway resistance in the „tight“ Cl^- secreting epithelium of the rabbit cornea*. J. Membr. Biol., 73(2):275–282.
- [MCCLURE 1974] MCCLURE, D. A. (1974). *ACS Symposiums Series 14, „Pro-drugs novel drug delivery systems“*. Chem. Abstr., 83(15):224–235.
- [MILLNER et al. 1974] MILLNER, O. E. JR., J. W. STANLEY und W. P. PURCELL (1974). *Synthesis and enzymatic evaluation of pyridostigmine analogs used to probe the active sites of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase*. J. Med. Chem., 17(1):13–18.
- [MISHIMA 1965] MISHIMA, S. (1965). *Some physiological aspects of the precorneal tear film*. Arch. Ophthalmol., 73:233–241.
- [MISHIMA 1982] MISHIMA, S. (1982). *Clinical investigations on the corneal endothelium — XXXVIII Edward Jackson Memorial Lecture*. Am. J. Ophthalmol., 93(1):1–29.
- [MISHIMA et al. 1966] MISHIMA, S., A. GASSET, S. D. KLYCE JR. und J. L. BAUM (1966). *Determination of tear volume and tear flow*. Invest. Ophthalmol., 5(3):264–276.
- [MITRA 1993] MITRA, A. K., Hrsg. (1993). *Ophthalmic drug delivery systems*, Kap. Ocular anatomy and physiology relevant to ocular drug delivery, S. 29–57. Marcel Dekker, New York.
- [MITRA und MIKKELSON 1988] MITRA, A. K. und T. J. MIKKELSON (1988). *Mechanism of transcorneal permeation of pilocarpine*. J. Pharm. Sci., 77(9):771–775.
- [MIYAJIMA et al. 1986] MIYAJIMA, K., M. YOKOI, M. KOMATSU und M. NAKAGAKI (1986). *Interaction of β -Cyclodextrin with bile salts in aqueous solution*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 34(3):1395–1398.
- [MOHSENI und HURTUBISE 1990] MOHSENI, R. M. und R. J. HURTUBISE (1990). *Retention characteristics of several compound classes in reversed-phase liquid chromatography with β -cyclodextrin as a mobile phase modifier*. J. Chromatogr., 499:395–410.

- [MOHSENI und HURTUBISE 1991] MOHSENI, R. M. und R. J. HURTUBISE (1991). *Changes in the enthalpy and entropy of hydroxyl aromatics in reversed-phase liquid chromatography with β -cyclodextrin in the mobil phase*. J. Chromatogr., 537:61–71.
- [MÜGGE 2001] MÜGGE, G. (2001). *Privatmitteilung*. Arbeitsgruppe-NMR, Fachbereich Chemie, Humboldt-Universität, Berlin.
- [MULDER und JACOBY 1990] MULDER, G. J. und W. B. JACOBY (1990). *Conjugation Reactions in Drug Metabolism*, Kap. Sulfation, S. 107–161. Taylor and Francis, London.
- [MÜLLER-BOHN 1996] MÜLLER-BOHN, T. (1996). *Fortbildung: Arzneimittel und Auge*. Deutsche Apoth. Zeit., 136(51/52):73–77.
- [MUTSCHLER 1991] MUTSCHLER, E. (1991). *Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 6 Aufl.
- [NAKAMURA et al. 1993a] NAKAMURA, M., E. SHIRASAWA und M. HIKIDA (1993a). *Characterisation of esterases involved in the hydrolysis of dipivefrin hydrochlorid*. Ophthalm. Res., 25(1):46–51.
- [NAKAMURA et al. 1993b] NAKAMURA, M., E. SHIRASAWA und M. HIKIDA (1993b). *No changes in rabbit corneal esterase activities with dipivefrin hydrochloride instillation for 4 weeks*. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 231:551.
- [NÄSER 1986] NÄSER, K.-H. (1986). *Physikalische Chemie für Techniker und Ingenieure*. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, Nachdruck der 16., bearbeiteten Aufl.
- [NEUFELD und PAGE 1977] NEUFELD, A. H. und E. D. PAGE (1977). *In vitro determination of the ability of drugs to bind to adrenergic receptors*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 16(12):1118–1124.
- [NIMMO et al. 1977] NIMMO, I. A., G. L. ATKINS, R. C. STRANGE und I. W. PERCY-ROBB (1977). *An evaluation of ways of using equilibrium dialysis to quantify the binding of ligand to macromolecule*. Biochem. J., 165(1):107–110.

- [NOWAK und SOCKO 1988] NOWAK, J. Z. und R. SOCKO (1988). *Histamine levels and activities of histamine metabolizing enzymes in mammalian ocular tissues: comparison between day and night*. Pol. J. Pharmacol. Pharm., 40(1):25–31.
- [NOWAK et al. 1993] NOWAK, J. Z., B. SYMANSKA, J. B. ZAWILSKA und B. BIALEK (1993). *Hydroxyindole-O-methyltransferase activity in ocular and brain structures of rabbit and hen*. J. Pineal. Res., 15(1):35–42.
- [OHRLOFF 1987] OHRLOFF, C. (1987). *Permeabilität der zellulären Grenzsichten der Hornhaut in vivo*. Fortschr. Ophthalmol., 84:307–312.
- [PATIL und TRENDELENBURG 1982] PATIL, P. N. und U. TRENDELENBURG (1982). *The extraneuronal uptake and metabolism of ^3H -Isoprenaline in the rabbit iris*. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 318(3):158–165.
- [PAVLIC 1972] PAVLIC, M. R. (1972). *Dissociation constants of esteratic center of butyrylcholinesterase*. Biochim. Biophys. Acta, 284(2):435–440.
- [PFEIFER et al. 1995] PFEIFER, S., P. PFLEGEL und H.-H. BORCHERT (1995). *Biopharmazie*. Ullstein Mosby, 3 Aufl.
- [POHL 2000] POHL, P. (2000). *Membrannaehe Konzentrationspolarisation als Indikator für den osmotisch getriebenen Volumenfluss*. Habilitation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [POST 1971] POST, L. C. (1971). *Inhibition of cholinesterases by carbamates. A new kinetic approach*. Biochim. Biophys. Acta, 250(1):121–130.
- [PRESS et al. 1995] PRESS, A., W. MEHNERT und K. H. FRÖMMING (1995). *Penetration of hydrocortisone into excised human skin under the influence of cyclodextrins*. Pharmazie, 50(2):121–126.
- [PURCELL et al. 1946] PURCELL, E. M., H. C. TORREY und R. V. POUND (1946). *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid*. Phys. Rev., 69:37–38.
- [RABI et al. 1938] RABI, I. I., J. R. ZACHARIAS, S. MILLMAN und P. KUSCH (1938). *A new method of measuring nuclear magnetic moments*. Phys. Rev., 53:318.

- [REDELL et al. 1983] REDELL, M. A., D. C. YANG und V. H. L. LEE (1983). *The role of esterase activity in the ocular disposition of dipivalyl epinephrine in rabbits*. Int. J. Pharm., 17:299–312.
- [REER et al. 1994] REER, O., T. BOCK und B. W. MÜLLER (1994). *In vitro corneal permeability of diclofenac-sodium in formulations containing cyclodextrins compared to the commercial product Voltaren Ophtha*. J. Pharm. Sci., 83(9):1345–1349.
- [RICHTMAN und TANG-LIU 1990] RICHTMAN, J. B. und D. D.-S. TANG-LIU (1990). *A corneal perfusion device for estimating ocular bioavailability in vitro*. J. Pharm Sci., 79(2):153–157.
- [ROTE LISTE 2002] ROTE LISTE (2002). *Rote Liste Service GmbH (Hrsg.)*. ECV Editio Cantor, Aulendorf.
- [RÜCKERT et al. 1988] RÜCKERT, G., M. NEUGEBAUER und G. G. WILLEMS (1988). *Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysenmethoden*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- [SAMPLES et al. 1989] SAMPLES, J. R., P. S. BINDER und S. NAYAK (1989). *The effect of epinephrine and benzalkonium chloride on cultured corneal endothelial and trabecular meshwork cells*. Exp. Eye Res., 49(1):1–12.
- [SANETO et al. 1982a] SANETO, R. P., Y. C. AWASTHI und S. K. SRIVASTAVA (1982a). *Mercapturic acid pathway enzymes in bovine ocular lens, cornea, retina and retinal pigmented epithelium*. Exp. Eye Res., 35(2):107–111.
- [SANETO et al. 1982b] SANETO, R. P., Y. C. AWASTHI und S. K. SRIVASTAVA (1982b). *Purification and characterization of glutathione S-transferases from the bovine cornea*. Exp. Eye Res., 35(3):279–286.
- [SATO et al. 1993] SATO, S., L. R. LIN, V. N. REDDY und P. F. KADOR (1993). *Aldose reductase in human retinal pigment epithelial cells*. Exp. Eye Res., 57(2):235–241.
- [SCHMIDT 2000] SCHMIDT, A. (2000). *Das Glaucom*. DAZ, Suppl. PTA-Heute, 2:3–5.

- [SCHOENWALD und HUANG 1983] SCHOENWALD, R. D. und H. S. HUANG (1983). *Corneal penetration behavior of β -blocking agents I: Physicochemical factors*. J. Pharm. Sci., 72(11):1266–1272.
- [SCHOLZ et al. 2002] SCHOLZ, M., S. SCHRÜNDER, S. GARTNER, S. KEIPERT, C. HARTMANN und U. PLEYER (2002). *Ocular drug permeation following experimental excimer laser treatment on the isolated pig eye*. J. Ocul. Pharmacol. Ther., 18(2):177–183.
- [SCHÜTTE 1987] SCHÜTTE, E. (1987). *Physiologie und Stoffwechsel der Cornea*. Fortschr. Ophthalmol., 84:399–403.
- [SCHWARTZMAN und ABRAHAM 1990] SCHWARTZMAN, M. L. und N. G. ABRAHAM (1990). *Ocular cytochrome P450 metabolism of arachidonate: synthesis and bioassay*. Meth. Enzymol., 187:372–384.
- [SCHWARTZMAN et al. 1987] SCHWARTZMAN, M. L., J. MASFERRER, M. W. DUNN, J. C. MCGRIFF und N. G. ABRAHAM (1987). *Cytochrome P450, drug metabolizing enzymes and arachidonic acid metabolism in bovine ocular tissues*. Curr. Eye Res., 6(4):623–630.
- [SCHWETLICK ET.AL. 1982] SCHWETLICK ET.AL., K. (1982). *Chemische Kinetik — Lehrbuch*. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.
- [SHAH et al. 1974] SHAH, V. P., S. M. WALLACE und S. RIEGELMAN (1974). *Microultrafiltration technique for drug-protein binding determination in plasma*. J. Pharm. Sci., 63(9):1364–1367.
- [SHANTAVERAPPA und BOURNE 1964] SHANTAVERAPPA, T. R. und G. H. BOURNE (1964). *Monoamine oxidase distribution in rabbit eye*. J. Histochem. Cytochem., 12:281–286.
- [SHICHI 1969] SHICHI, H. (1969). *Microsomal electron transfer system of bovine retinal pigment epithelium*. Exp. Eye Res., 8(1):60–68.
- [SHICHI und NEBERT 1982] SHICHI, H. und D. W. NEBERT (1982). *Genetic differences in drug metabolism associated with ocular toxicity*. Environ. Health Perspect., 44:107–117.

- [SHIMADA et al. 1987] SHIMADA, S., H. MISHIMA, S. KITAMURA und K. TATSUMI (1987). *Nicotinamide N-oxide reductase activity in bovine and rabbit eyes*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 28(7):1204–1206.
- [SHIMADA et al. 1988] SHIMADA, S., H. MISHIMA, S. KITAMURA und K. TATSUMI (1988). *Metabolism of drugs in the eye. Drug-reducing activity of preparations from bovine ciliary body*. Curr. Eye Res., 7(11):1069–1075.
- [SHIMADA et al. 1989a] SHIMADA, S., H. K. MISHIMA, H. NIKAIDO, S. KITAMURA und K. TATSUMI (1989a). *Metabolism of drugs in the eye. Menadione-dependent reduction of tertiary amine N-oxide by preparations from bovine ocular tissues*. Curr. Eye Res., 8(12):1309–1313.
- [SHIMADA et al. 1989b] SHIMADA, S., H. K. MISHIMA, H. NIKAIDO, S. KITAMURA und K. TATSUMI (1989b). *Purification of aldehyde oxidase from bovine ciliary body*. Curr. Eye Res., 8(7):721–726.
- [SHIONO et al. 1986] SHIONO, T., S. HAYASAKA und K. MIZUNO (1986). *Acid hydrolases in the bovine corneal epithelium*. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 224(5):467–468.
- [SIEFERT 1998] SIEFERT, B. (1998). *Einfluß von Cyclodextrin auf die Löslichkeit und okulare Verfügbarkeit von Pilocarpin-HCl bzw. Thalidomid — Penetrations- und Permeationsstudien an isolierter Cornea*. Promotion, Humboldt-Universität, Berlin.
- [SIEFERT und KEIPERT 1997] SIEFERT, B. und S. KEIPERT (1997). *Influence of α -cyclodextrin and hydroxyalkylated β -cyclodextrin derivatives on the in vitro corneal uptake and permeation of aqueous pilocarpine-HCl solutions*. J. Pharm. Sci., 86(6):716–720.
- [SIEFERT et al. 1999] SIEFERT, B., U. PLEYER, M. MÜLLER, C. HARTMANN und S. KEIPERT (1999). *Influence of cyclodextrins on the in vitro corneal permeability and in vivo ocular distribution of thalidomide*. J. Ocul. Pharmacol. Ther., 15(5):429–438.
- [SIGMA CELL CULTURE REAGENTS 1982] SIGMA CELL CULTURE REAGENTS (1982). *Vorschrift „Hanks´ Balanced Salts“ : H 1387, with added sodium bicarbonate*. Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen.

- [SIGMA TECHNISCHER SERVICE 2001] SIGMA TECHNISCHER SERVICE (2001). *Certificate of analysis: Cholinesterase, Butyryl*. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen.
- [SITTIG 1988] SITTIG, M. (1988). *Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia*, Bd. 1. Noyes Publications, Park Ridge, N.J., 2 Aufl.
- [SMITH 1974] SMITH, R. (1974). *The estimation of serum cholinesterase in the presence of anti-cholinesterase insecticides*. Clin. Chim. Acta, 52(3):315–319.
- [SOPHIANOPOULOS et al. 1978] SOPHIANOPOULOS, J. A., S. J. DURHAM, A. J. SOPHIANOPOULOS, H. L. RAGSDALE und W. P. CROPPER JR. (1978). *Ultrafiltration is theoretically equivalent to equilibrium dialysis but much simpler to carry out*. Arch, Biochem. Biophys., 187(1):132–137.
- [SØRENSEN und TAAGEHØJ JENSEN 1979] SØRENSEN, T. und F. TAAGEHØJ JENSEN (1979). *Tear flow in normal human eyes. Determination by means of radioisotope and gamme camera*. Acta Ophthalmol. (Copenh.), 57(4):564–581.
- [STANLEY 1972] STANLEY, J. A. (1972). *Water permeability of the human cornea*. Arch. Ophthalmol., 87(5):568–573.
- [STANLEY et al. 1974] STANLEY, J. W., I. W. MATHISON und J. G. BEASLEY (1974). *Synthesis and enzymatic evaluation of some N-alkyl branched chain piperidine salts and N-alkyl-3-(N,N-diethylcarbamoyl) piperidine salts as inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase*. J. Med. Chem., 17(1):8–12.
- [STRATFORD JR. und LEE 1985] STRATFORD JR., R. E. und V. H. L. LEE (1985). *Aminopeptidase activity in albino rabbit extraocular tissues relative to the small intestine*. J. Pharm. Sci., 74(7):731–734.
- [SZEJTLI 1982] SZEJTLI, J. (1982). *Cyclodextrins and their inclusion complexes*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- [SZEJTLI 1988] SZEJTLI, J. (1988). *Cyclodextrin Technology*. Kluwer Academic Publishers, AA Dordrecht.
- [TANG-LIU et al. 1987] TANG-LIU, D. D., S. LIU, J. NEFF und R. SANDRI (1987). *Disposition of levobunolol after an ophthalmic dose to rabbits*. J. Pharm. Sci., 76(10):780–783.

- [TANIGUCHI et al. 1988] TANIGUCHI, K., K. ITAKURA, N. YAMAZAWA, K. MORISAKI, S. HAYASHI und Y. YAMADA (1988). *Efficacy of a liposome preparation of anti-inflammatory steroid as an ocular drug-delivery system*. J. Pharmacobiodyn., 11(1):39–46.
- [THEWS et al. 1999] THEWS, G., E. MUTSCHLER und P. VAUPEL (1999). *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 5. erweiterte Aufl.
- [THIEL 1970] THIEL, R. (1970). *Therapie der Augenkrankheiten*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [TILDEN und HUDSON 1939] TILDEN, E. B. und C. S. HUDSON (1939). *The conversion of starch to crystallin dextrin by the action of a new type of amylase separated from cultures of aerobacillus macerans*. J. Am. Chem. Soc., 61:2900–2903.
- [TRIPATHI und TRIPATHI 1984] TRIPATHI, B. J. und R. C. TRIPATHI (1984). *Effect of epinephrine in vitro on the morphology, phagocytosis, and the mitotic activity of human trabecular endothelium*. Exp. Eye Res., 39(6):731–744.
- [TSUJI et al. 1987] TSUJI, A., I. TAMAI und K. SASAKI (1987). *Hydrolysis of prednisolone succinate by esterase in rabbit ocular tissue*. Ophthalmic. Res., 19(6):322–329.
- [UEKAMA et al. 1977] UEKAMA, K., F. HIRAYAMA, K. IKEDA und K. INABA (1977). *The new method for determination of the stability constants of cyclodextrin-prostaglandin inclusion complexes by liquid chromatography*. J. Pharm. Sci., 66(5):706.
- [UEKAMA et al. 1978] UEKAMA, K., F. HIRAYAMA und T. IRIE (1978). *Utilisation of cyclodextrine complexation for separation of E, A and B prostaglandins by ion-exchange liquid chromatography*. Chem. Lett., 265:661–664.
- [UEKAMA et al. 1994] UEKAMA, K., T. HORIKAWA, M. YAMANAKA und F. HIRAYAMA (1994). *Peracetylated β -cyclodextrins as novel sustained-release carriers for a water-soluble drug, molsidomin*. J. Pharm. Pharmacol., 46(9):714–717.

- [USAYAPANT et al. 1991] USAYAPANT, K., A. H. KARARA und M. M. NARURKAR (1991). *Effect of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the ocular absorption of dexamethasone and dexamethasone acetate*. Pharm. Res., 8(12):1495–1499.
- [VALERI et al. 1989] VALERI, P., L. ROMANELLI, B. MARTINELLI, A. GUGLIELMOTTI und B. CATANESE (1989). *Time-course of aspirin and salicylate in ocular tissues of rabbits*. Lens Eye Toxic. Res., 6(3):465–475.
- [VAN DOORNE 1993] VAN DOORNE, H. (1993). *Interactions between cyclodextrins and ophthalmic drugs*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 39:133–139.
- [WACKER-CHEMIE 1996] WACKER-CHEMIE (1996). *Cyclodextrins Wacker-Chemie - Specifications and toxicological data*. München.
- [WALL et al. 1992] WALL, G. M., J. C. KENNY, T. Y. FAN, C. SCHAFER, M. A. READY, J. K. BAKER, P. RITTER und B. S. SCOTT (1992). *Analysis of 3- and 4-monopivaloyl epinephrine, degradation products in dipivefrin hydrochloride drug substance and ophthalmic formulations..* J. Pharm. Biomed. Anal., 10(6):465–471.
- [WALTMAN und SEARS 1964] WALTMAN, S. und M. SEARS (1964). *Catechol o-methyltransferase and monoamin oxidase in ocular tissue*. Invest. Ophthalmol., 3:601–607.
- [WANG et al. 1977] WANG, B. C., D. D. BLOXHAM und K. L. GOETZ (1977). *Effect of dipivalyl derivatives of catecholamines on cardiovascular function in the conscious dog*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 203(2):442–448.
- [WATKINS III. et al. 1991] WATKINS III., J. B., D. P. WIRTHWEIN und R. A. SANDERS (1991). *Comparative study of phase II biotransformation in rabbit ocular tissues*. Drug Metab. Dispos., 19(3):708–713.
- [WEBER et al. 1990] WEBER, W. W., G. N. LEVY und D. W. HEIN (1990). *Conjugation Reactions in Drug Metabolism*, Kap. Acetylation, S. 163–191. Taylor and Francis, London.
- [WHITLAM und BROWN 1981] WHITLAM, J. B. und K. F. BROWN (1981). *Ultrafiltration in serum protein binding determinations*. J. Pharm. Sci., 70(2):146–150.

- [WIGHAM et al. 1996] WIGHAM, C. G., H. C. TURNER, C. C. OGBUEHI und S. A. HODSON (1996). *Two pathways for electrogenic bicarbonate ion movement across the rabbit corneal endothelium*. Biochim. Biophys. Acta, 1279:104–110.
- [WRIGHTON und STEVENS 1992] WRIGHTON, S. A. und J. C. STEVENS (1992). *The human hepatic cytochromes P₄₅₀ involved in drug metabolism*. Crit. Rev. Toxicol., 22(1):1–21.
- [YAMAUCHI et al. 1988] YAMAUCHI, H., M. SASANO und T. ISO (1988). *pH dependency of effect of topically applied dipivefrine hydrochloride on intraocular pressure and pupil size in rabbits: comparative studies with epinephrine*. Jpn. J. Ophthalmol., 32(2):187–195.
- [YUSUFF und YORK 1991] YUSUFF, N. und P. YORK (1991). *Spirolactone-cyclodextrin complexes: phase solubility and ultrafiltration studies*. Int. J. Pharm., 73:9–15.
- [YUSUFF et al. 1991] YUSUFF, N. T., P. YORK, H. CHRYSTYN, P. N. B. R. D. SWALLOW, B. R. TULADHAR und M. S. LOSOWSKY (1991). *Improved bioavailability from a spironolactone beta-cyclodextrin complex*. Eur. J. Clin. Pharmacol., 40(5):507–511.
- [ZADUNAISKY 1966] ZADUNAISKY, J. A (1966). *Active transport of chloride in the frog cornea*. Am. J. Physiol., 21:506–512.
- [ZIEGLER 1988] ZIEGLER, D. M. (1988). *Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities*. Drug. Metab. Rev., 19(1):1–32.
- [ZUKOWSKI et al. 1985] ZUKOWSKI, J., D. SYBILSKA und J. JURCZAK (1985). *Resolution of ortho, metha and para isomers of some distributed benzene derivatives via β -cyclodextrin inclusion complexes, using reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Anal. Chem., 57:2215.

Anhang A

Methoden

A.1 Gehaltsbestimmungen

A.1.1 UV/VIS-Spektroskopie

Zur Gehaltsbestimmung wurde ein Spektralphotometer (s. Anh. B) verwendet. Mit Hilfe einer Stammlösung DPE ($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) wurden Verdünnungsreihen (5, 10, 20, 30, 40 und $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) hergestellt und das Gerät bei einer Wellenlänge von 220 nm kalibriert. Die aus den Messwerten errechnete spezifische Absorption beträgt $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 14,6$.

Von den Permeaten der Ultrafiltration wurden jeweils $300\text{ }\mu\text{l}$ auf $800\text{ }\mu\text{l}$ verdünnt und in Halbmikroküvetten der Schichtdicke 1,000 cm vermessen.

A.1.2 HPLC (Dipivefrin, Epinephrin)

In Anlehnung an die Referenzmethoden für die verwendete Säule wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die die gleichzeitige Bestimmung von Dipivefrin und Epinephrin erlaubt. Die Kalibrierung erfolgte über die Herstellung von Kalibrierstandardlösungen der externen Standards und in einem Konzentrationsbereich von $0,005\text{--}1,0\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Für die im Anhang B genannten Geräte galten folgende Versuchsbedingungen.

Tabelle A.1: HPLC-Parameter für die Gehaltsbestimmung von Dipivefrin und Epinephrin

Mobile Phase	Acetonitril:Phosphatpuffer pH 2,0 (30:60)
Fließgeschwindigkeit	2,0 ml·min ⁻¹
Säule	LiChrospher® 100, RP-18 (5 µm, 125-4 (Merck))
Vorsäule	LiChrospher® 100, RP-18 (5 µm, 4-4 (Merck))
Detektionswellenlänge	220 nm
Injektionsvolumen	20 µl, Rheodyne® (Rheodyne, Cotati, USA)
Externe Standards	Dipivefrin-Hydrochlorid, Epinephrin
Säulen-Temperatur	30 °C

A.1.3 Polarimetrie

Zur analytischen Erfassung des möglichen Durchtrittes von CD durch das Ultrafilter wurde die optische Aktivität der CD ausgenutzt und die CD-Menge im Ultrafiltrat polarimetrisch untersucht. Bei der Polarimetrie wird die Drehung der Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht ermittelt. Der gemessene Drehungswinkel ist von einer Reihe von Faktoren abhängig, von der Temperatur, dem Lösungsmittel, der Schichtdicke, der Wellenlänge und der Konzentration. Die Gleichung A.1 beschreibt den Zusammenhang zwischen Drehungswinkel einer gelösten Substanzprobe und deren Konzentration.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{1000 \cdot \alpha}{c \cdot l} \quad (\text{A.1})$$

$$\begin{aligned}
 [\alpha]_D^{20} & \dots \text{ spezifische Drehung } [\text{Grad} \cdot \text{ml} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}] \\
 \alpha & \dots \text{ gemessener Drehungswinkel } [\text{Grad}] \\
 c & \dots \text{ Konzentration } [\text{g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}] \text{ } [\%(\text{m/V})] \\
 l & \dots \text{ Schichtdicke } [\text{cm}]
 \end{aligned}$$

Der Betrag der optischen Drehung und z.T. die Richtung ist von der verwendeten Wellenlänge abhängig. Diese Erscheinung nennt man Optische Rotationsdispersion (ORD). Bei der „normalen Rotationsdispersion“ nimmt der Betrag

der Drehung mit abnehmender Wellenlänge stetig zu. Dies wird ausgenutzt, um die Empfindlichkeit der Messung zu erhöhen. Anstelle der häufig verwendeten Natrium-D-Linie (589 nm) werden Linien aus dem Spektrum einer Quecksilberdampfampe (578 nm, 564 nm, 436 nm, 365 nm, 253 nm) verwendet. Die für die Messung mit dem Polarimeter (s. Anh. B) notwendigen Einstellungen und Details sind in Tabelle A.2 aufgeführt.

Tabelle A.2: Gerätespezifische Einstellungen und Parameter bei der polarimetrischen Gehaltsbestimmung der Cyclodextrine

Wellenlänge	253 nm
Spaltbreite	0,4 mm
Integrator	20 s
Küvette	ORD, 8867QS Quartz 2,002 cm, 1,3 ml
Temperatur	20 °C

Zur Kalibrierung der Methode wurden die Drehwinkel der CD im Bereich von $0,05\text{--}1,00\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bestimmt. In dem betrachteten Intervall ist für alle CD eine lineare Kalibrierung möglich. Die Werte für die spezifische Drehung der einzelnen CD sind Tabelle A.3 zu entnehmen.

Für die Messung der Durchlässigkeit der Ultrafilter wurden von α -, HP- α -, β -, HP- β -, γ - und HP- γ - Lösungen mit einer Konzentration von $1,80\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hergestellt. Je 6 Zellen wurden mit 1,0 ml CD-Lösung beschickt. Es wurde in der Zentrifuge ein Filtrationsvorlauf (5 min bei 5000 min^{-1}) erzeugt, der verworfen wurde. Danach begann die Filtration während 60 min bei 5000 min^{-1} . Von den erhaltenen Permeaten (6 mal ca. 0,7–0,8 ml) wurden je zwei vereinigt, um das notwendige Volumen für die Messzelle von 1,3 ml zu erhalten und der Gehalt an CD bestimmt.

Tabelle A.3: Werte der spezifischen Drehung der Cyclodextrine

	spezifische Drehung $[\alpha]_{253}^{20}$ [Grad]
α -CD	+1289
HP- α -CD	+935,8
β -CD	+1170
HP- β -CD	+1047
γ -CD	+1259
HP- γ -CD	+1110

A.2 Bestimmung physikalisch-chemischer Parameter

A.2.1 pH-Wert

Der pH-Wert wurde mit einem System (s. Anh. B) mit automatischer Temperaturkompensation gemessen. Vor jeder Messreihe erfolgte eine gerätespezifische automatische Kalibrierung des Systems pH-Meter/Elektrode mit zwei der für den vorgesehenen Messbereich geeigneten Pufferlösungen aus einem Satz von Lösungen (pH 4,01, pH 7,00, pH 9,21).

A.2.2 Osmolarität

Die Osmolarität wurde mittels eines Halbmikroosmometers (s. Anh. B) gemessen. Zur Kalibrierung wurden bidestilliertes Wasser ($0 \text{ mOsmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) und eine 1,2687 %ige Natriumchloridlösung ($400 \text{ mOsmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) verwendet.

A.3 Überprüfung der lagerungsbezogenen enzymatischen Aktivität des Epithelhomogenats

Nach der Herstellung der Cornea-Epithelhomogenate wurde ein Teil der Proben sofort für enzymatische Untersuchungen verwendet. Der diskontinuierliche Zugang zum Organmaterial machte eine chargenweise Aufbewahrung von hergestelltem Homogenat unerlässlich. Von den bei -84°C eingefrorenen Proben wurde jeweils eine Probe der Charge für einen Vergleichsversuch verwendet. Mit ihr wurde die enzymatische Abbauleistung an DPE innerhalb von 90 min gemessen und mit den Werten von frisch verwendetem Homogenat verglichen. Die gemessenen Vergleichsproben wurden nach maximaler Lagerdauer klassiert in den Gruppen: Lagerdauer ≤ 1 Monat, ≤ 3 Monate und ≤ 6 Monat. Ältere Chargen wurden nicht verwendet, jedoch auch für 12 Monate gelagertes Material Vergleichsbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser vergleichenden Untersuchungen hinsichtlich der enzymatischen Aktivität des Corneaepithels sind in Tabelle A.4 wiedergegeben.

Tabelle A.4: Enzymatische Epithelaktivität nach Langzeitlagerung, DPE Umsatz nach 90 min; $10 \leq n \leq 22$, $p < 0,05$

Lagerzeit [Monate]	DPE-Umsatz [%]
keine Lagerung	$35 \pm 4,9$
≤ 1	$36 \pm 3,8$
≤ 3	$34 \pm 4,2$
≤ 6	$34 \pm 4,0$
$= 12$	$30 \pm 2,2$

Bei einer Lagerdauer bis zu 6 Monaten bewegten sich die Schwankungen in der Breite der individuellen Schwankungen der einzelnen Chargen von Frischmaterial. Die gelagerten Homogenate sind ohne Einschränkungen für die Versuche verwendbar. Die Ergebnisse der 12-monatigen Lagerung sprechen dagegen für eine Beschränkung der Lagerungszeit.

A.4 Statistik

In den Abbildungen und Tabellen werden die Mittelwerte der Messungen und ihre Standardabweichung angegeben. Die Auswertungen erfolgten mit einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p < 0,05$). Die Prüfung auf signifikante Unterschiede der Messreihen erfolgte bei gleichen Varianzen mit dem Student t-Test, bei ungleichen Varianzen mit dem Welch t-Test (jeweils zweiseitig). Die Prüfung auf Linearität von Messwerten erfolgte durch lineare Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate.

Anhang B

Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Polarimeter 241 MC	Perkin Elmer GmbH, Überlingen
pH-Meter 766 Calimatic	Knick GmbH, Berlin
pH-Elektrode SE 101	Kick GmbH, Berlin
Potter-S	B. Braun AG, Melsungen
Schüttelinkubator 3032	GFL mbH, Burgwedel
L-5025 Column Thermostat	Merck, Darmstadt
L-4250 UV-Vis Detector	Merck-Hitachi, Tokyo
Differential Refractometer RI-71	Merck, Darmstadt
L-6000 Pump	Merck-Hitachi, Tokyo
D-6000 AIF Interface	Merck-Hitachi, Tokyo
Halbmikro-Osmometer Typ Dig. L	Knauer, Berlin
D 6000 HPLC-Manager Version 2	Merck, Darmstadt & Hitachi Instr. Inc., San Jose USA
UV/VIS-Scanning Spectralphotometer	Shimadzu Corporation, Japan
600 MHz-Spektrometer, Typ AMX 600	Bruker, Karlsruhe
Zentrifuge: Medifuge 200 S,	Heraeus, Hanau
Digitalthermometer DTM 1010 mit	
Temperaturfühler Typ 277	Thermometerwerk, Geraberg
(Flüssigkeiten und Gase)	

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Simultan-Thermo-Analyse STA 409 C Meßteil	Netzsch, Sleb
TA-System-Controller TASC 414/3	Netzsch, Selb
Thermostat RTE-101	Neslab, Karlsruhe

Anhang C

Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Acetonitril	Baker, Deventer
α -Cyclodextrin	Wacker Chemie AG, München
β -Cyclodextrin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Butyrylcholinesterase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid	Laborchemie Apolda, Apolda
Carbogen (5 % CO ₂) in Sauerstoff	Linde, Berlin
d Epifrin® 0,1%	Pharm-Allergan GmbH, Ettlingen
Dinatriumhydrogenphosphat	Laborchemie Apolda, Apolda
Dipivefrin-Hydrochlorid	Klinge Pharma GmbH, München
Epinephrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
γ -Cyclodextrin	Merck KGaA, Darmstadt
Glaucothil® 0,1%	Alcon Pharma GmbH, Freiburg
Glucose	Caelo, Hilden
Hydroxypropyl- α -Cyclodextrin	Merck KGaA, Darmstadt
Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin	Merck KGaA, Darmstadt
Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Laborchemie Apolda, Apolda
Kaliumdihydrogenphosphat	Laborchemie Apolda, Apolda
Magnesiumchlorid	Laborchemie Apolda, Apolda
Magnesiumsulfat	Laborchemie Apolda, Apolda

<i>Substanz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Natriumhydroxid	Baker, Deventer
Natriumchlorid	Caelo, Hilden
Natrimchloridlösung 1,2687 %	Knauer, Berlin
Natriumhydrogencarbonat	Laborchemie Apolda, Apolda
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Pivalylsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Alle verwendeten Chemikalien und Produkte entsprechen entweder den Vorschriften des Europäischen Arzneibuches in der derzeit gültigen Fassung oder den Anforderungen „research grad“ laut den Vorschriften der jeweiligen Hersteller.

Tabelle C.2: Eigenschaften der verwendeten Butyrylcholinesterase nach [SIGMA TECHNISCHER SERVICE 2001]

Produkt Name	Cholinesterase, Butyryl
Produkt Nummer	C1057
CAS Nummer	9001085
Vertriebsform	lyophilisiertes Pulver
Proteingehalt(Biuret-Methode)	21 %
Enzymatische Aktivität	1,660 units·mg ⁻¹
pH-Wert des Assay	8,0
Temperatur des Assay	37 °C

Tabelle C.3: Zusammensetzung des Phosphatpuffers pH 2,0 aus [EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH 3. AUSGABE 1997 1997]

	[g·l ⁻¹]
Na ₂ HPO ₄	8,95
KH ₂ PO ₄	3,40

Tabelle C.4: Zusammensetzung des glucosehaltigen Vollelektrolytpuffers pH 7,4, 286 mOsmol („Hanks´ Balanced Salt Solution“) [SIGMA CELL CULTURE RE-AGENTS 1982]

	[g·l ⁻¹]
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,185
MgSO ₄	0,09767
KCl	0,40
KH ₂ PO ₄	0,06
NaHCO ₃	0,35
NaCl	8,00
Na ₂ HPO ₄	0,04788
Glucose	1,0

Anhang D

Abbildungen

D.1 Hydrolyse-Umsätze im Epithel-Homogenat

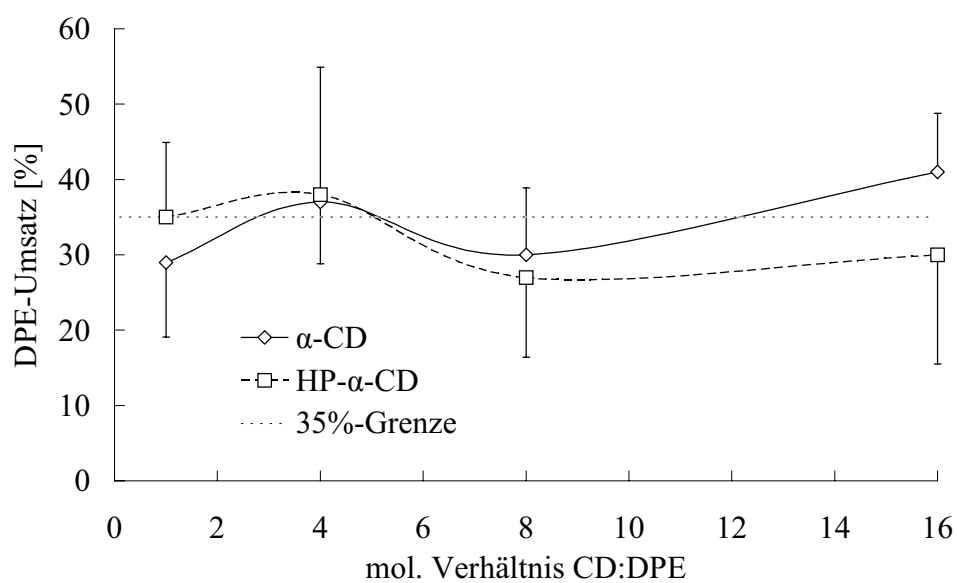


Abbildung D.1: Hydrolyse-Umsatz von DPE im Epithel-Homogenat nach 90 min in Anwesenheit von α - und HP- α -CD; $\bar{x} \pm s$

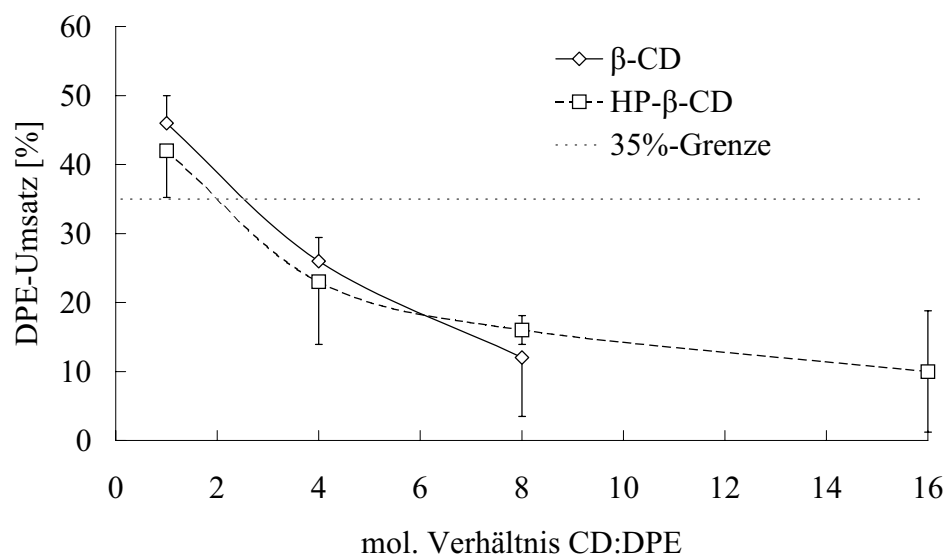


Abbildung D.2: Hydrolyse-Umsatz von DPE im Epithel-Homogenat nach 90 min in Anwesenheit von β - und HP- β -CD; $\bar{x} \pm s$

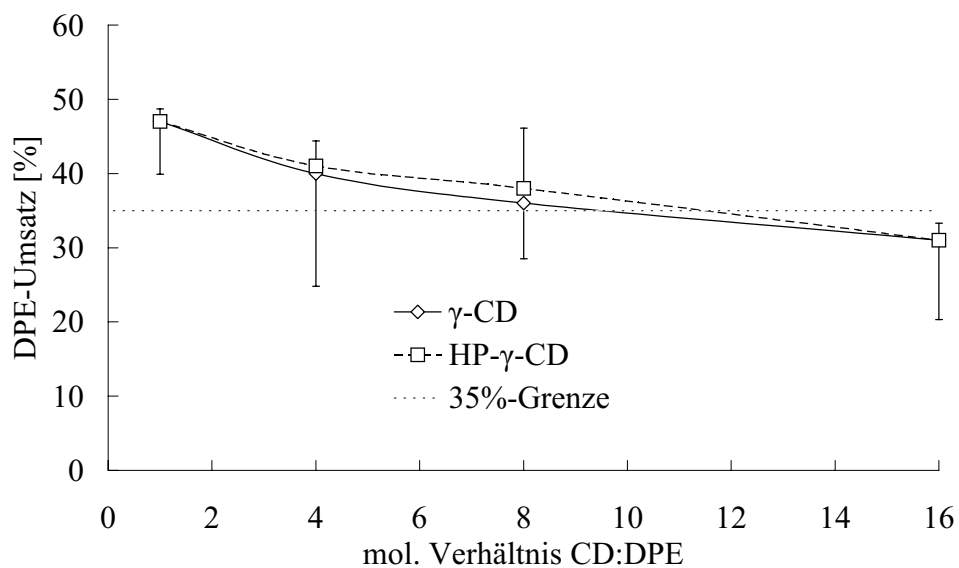


Abbildung D.3: Hydrolyse-Umsatz von DPE im Epithel-Homogenat nach 90 min in Anwesenheit von γ - und HP- γ -CD; $\bar{x} \pm s$

D.2 Hydrolyse-Umsätze durch ButChE

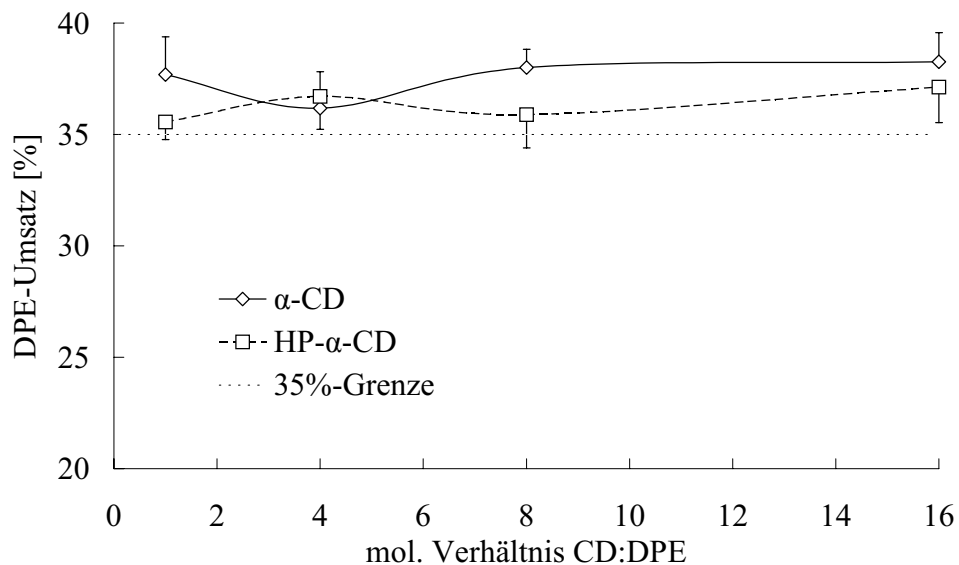


Abbildung D.4: Hydrolyse-Umsatz von DPE durch ButChE nach 90 min in Anwesenheit von α - und HP- α -CD; $\bar{x} \pm s$

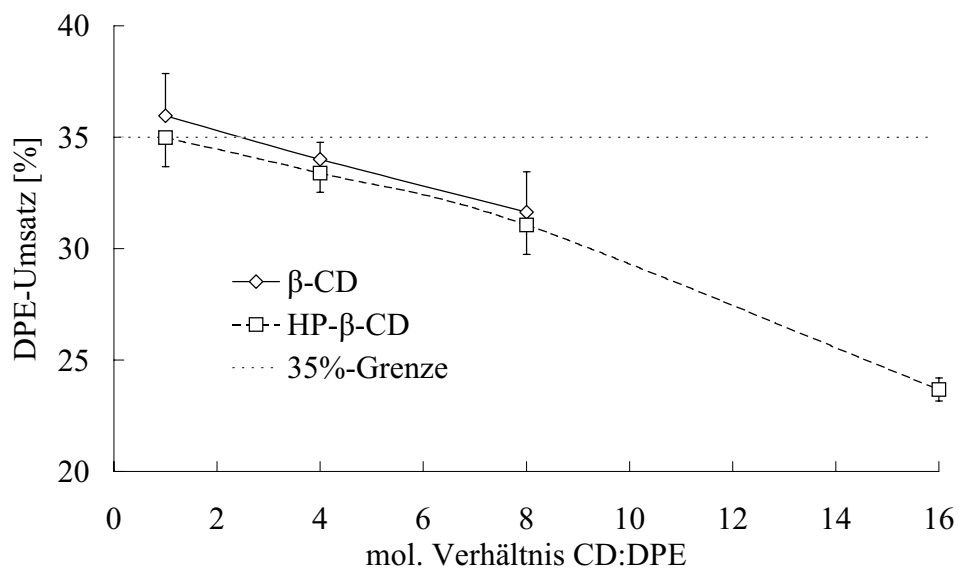


Abbildung D.5: Hydrolyse-Umsatz von DPE durch ButChE nach 90 min in Anwesenheit von β - und HP- β -CD; $\bar{x} \pm s$

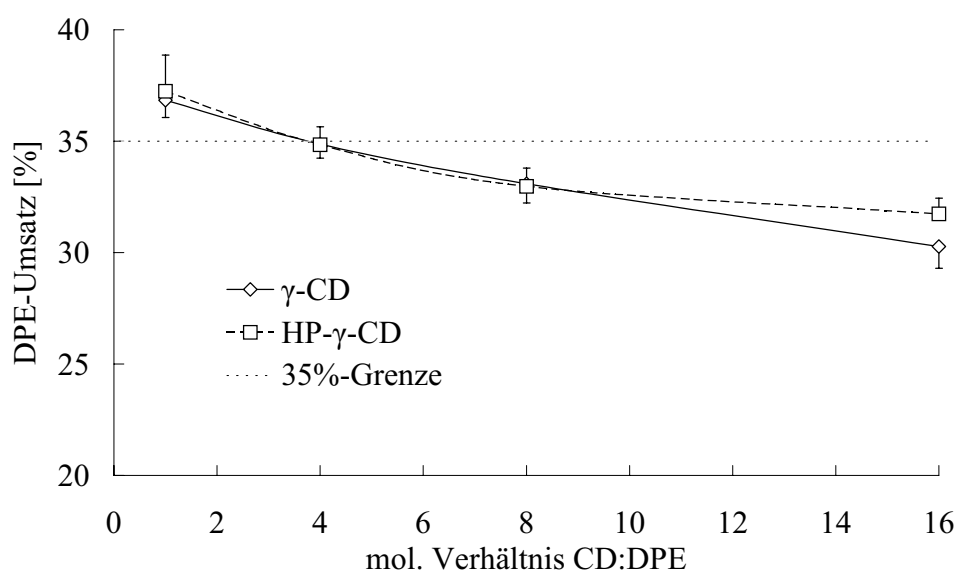


Abbildung D.6: Hydrolyse-Umsatz von DPE durch ButChE nach 90 min in Anwesenheit von γ - und HP- γ -CD; $\bar{x} \pm s$

D.3 Umsatz-Vergleich Homogenat vs. ButChE

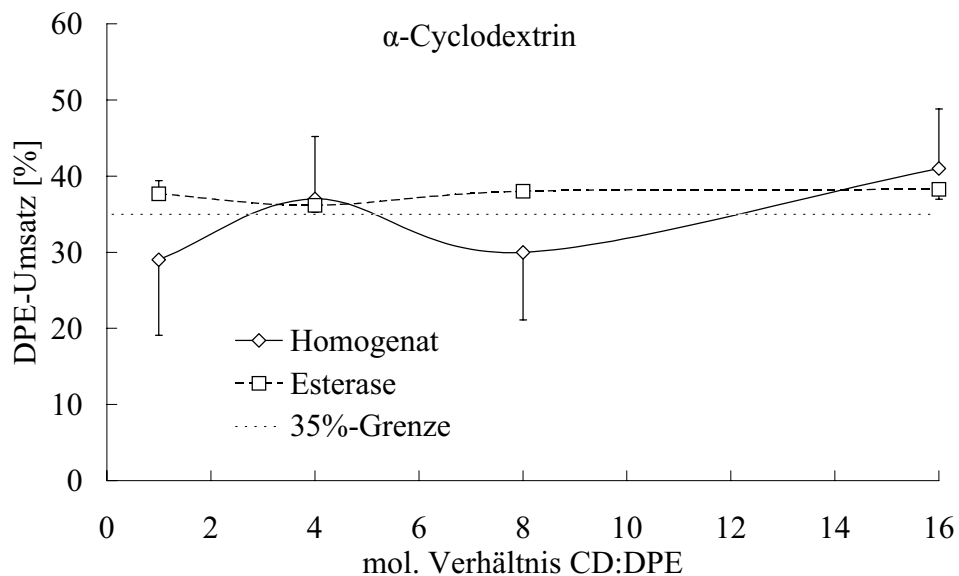


Abbildung D.7: Vergleich des Hydrolyse-Umsatzes von DPE im Homogenat und durch ButChE nach 90 min in Anwesenheit von α -CD; $\bar{x} \pm s$

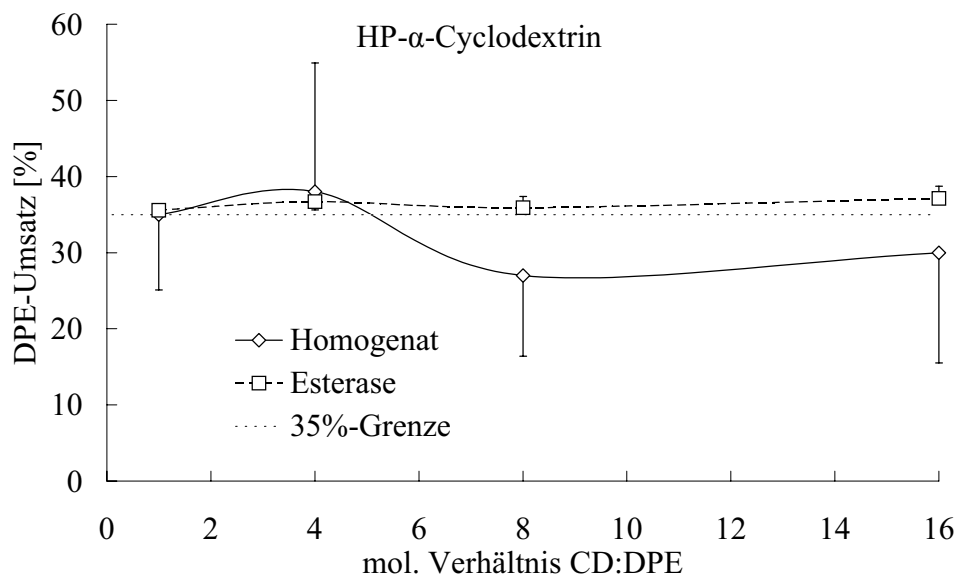


Abbildung D.8: Vergleich des Hydrolyse-Umsatzes von DPE im Homogenat und durch ButChE nach 90 min in Anwesenheit von HP- α -CD; $\bar{x} \pm s$

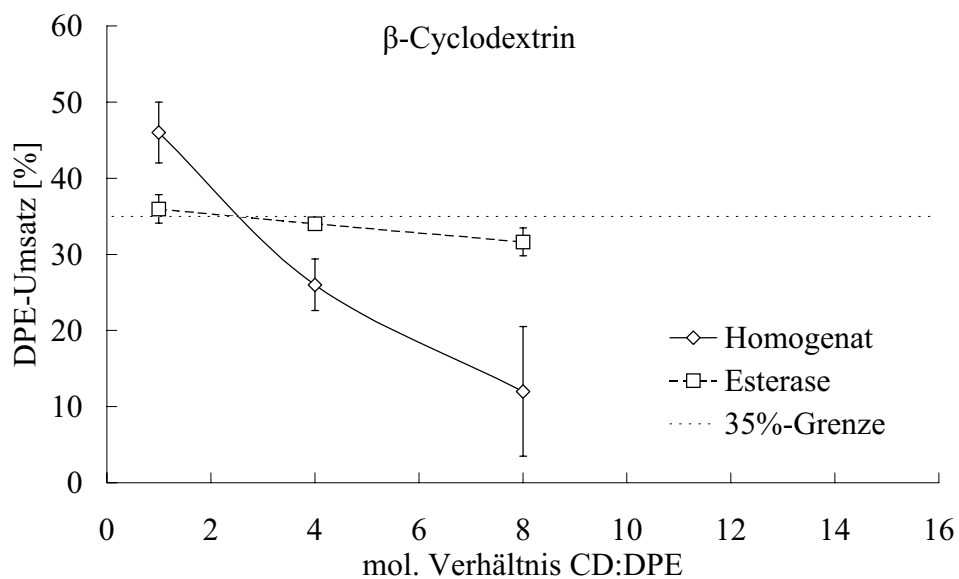


Abbildung D.9: Vergleich des Hydrolyse-Umsatzes von DPE im Homogenat und durch ButChE nach 90 min in Anwesenheit von β -CD; $\bar{x} \pm s$

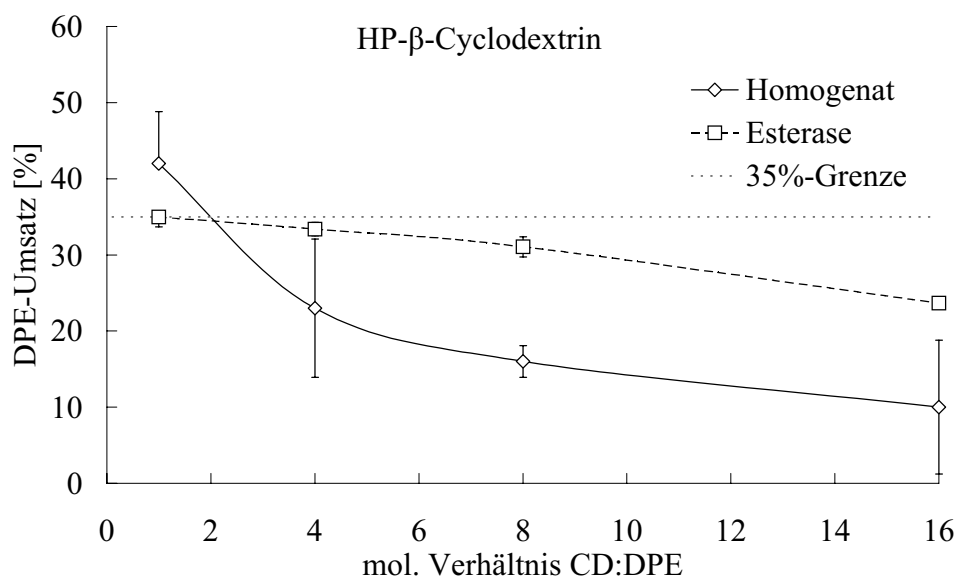


Abbildung D.10: Vergleich des Hydrolyse-Umsatzes von DPE im Homogenat und durch ButChE nach 90 min in Anwesenheit von HP- β -CD; $\bar{x} \pm s$

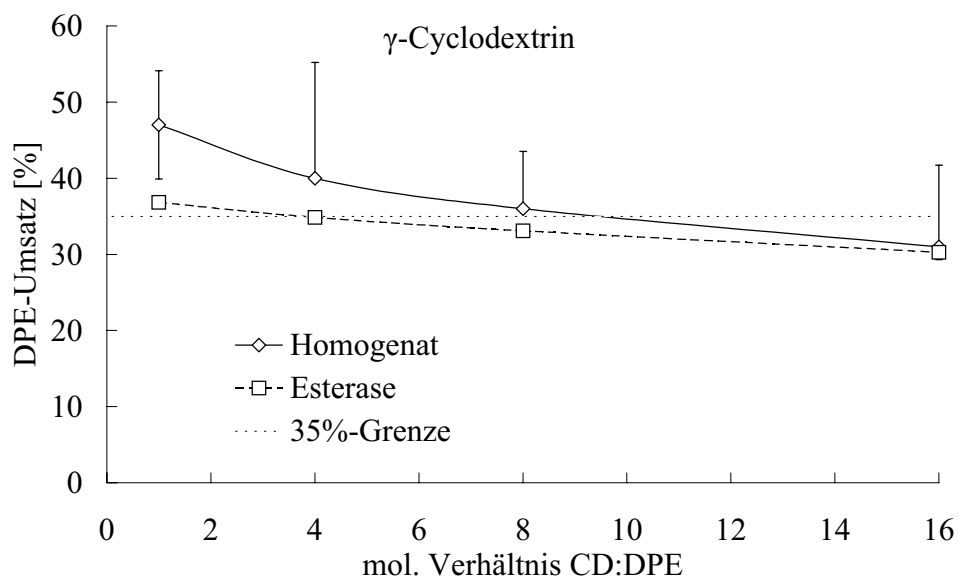


Abbildung D.11: Vergleich des Hydrolyse-Umsatzes von DPE im Homogenat und durch ButChE nach 90 min in Anwesenheit von γ -CD; $\bar{x} \pm s$

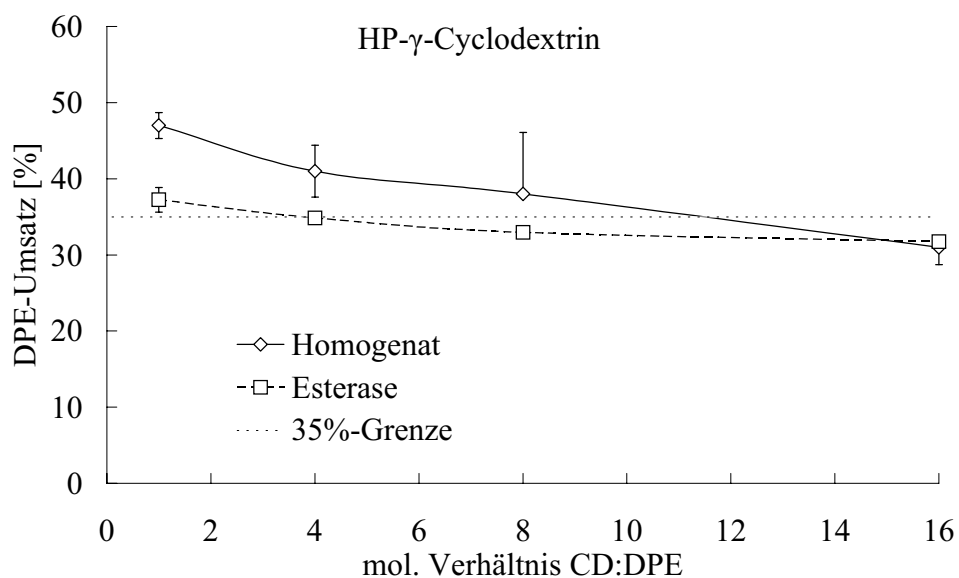


Abbildung D.12: Vergleich des Hydrolyse-Umsatzes von DPE im Homogenat und durch ButChE nach 90 min in Anwesenheit von HP- γ -CD; $\bar{x} \pm s$

D.4 Normierte Dipivefrin-Umsätze

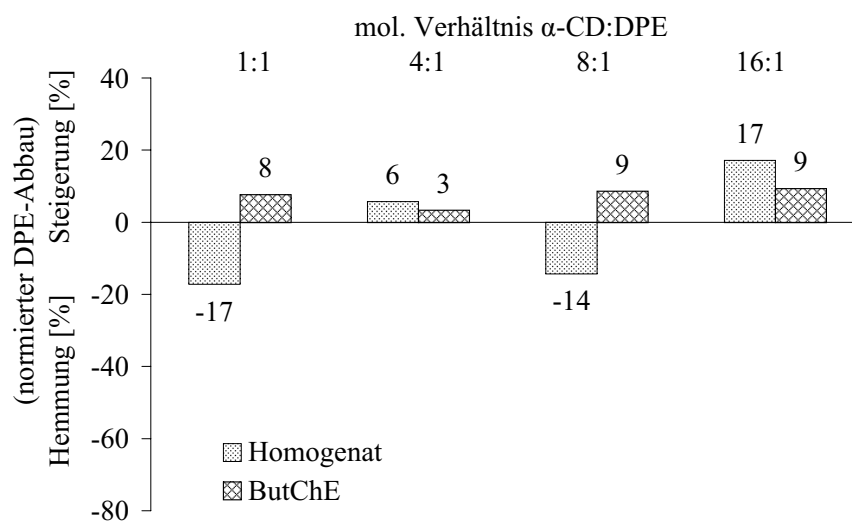


Abbildung D.13: Normierter Dipivefrin-Umsatz im Epithelhomogenat und durch ButChE in Abhängigkeit von unterschiedlichen molaren Verhältnisse von α -CD:DPE

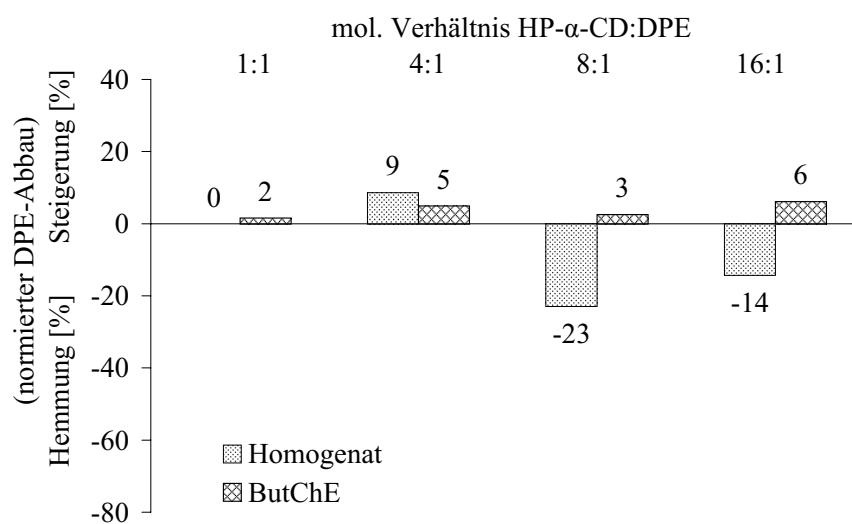


Abbildung D.14: Normierter Dipivefrin-Umsatz im Epithelhomogenat und durch ButChE in Abhängigkeit von unterschiedlichen molaren Verhältnisse von HP- α -CD:DPE

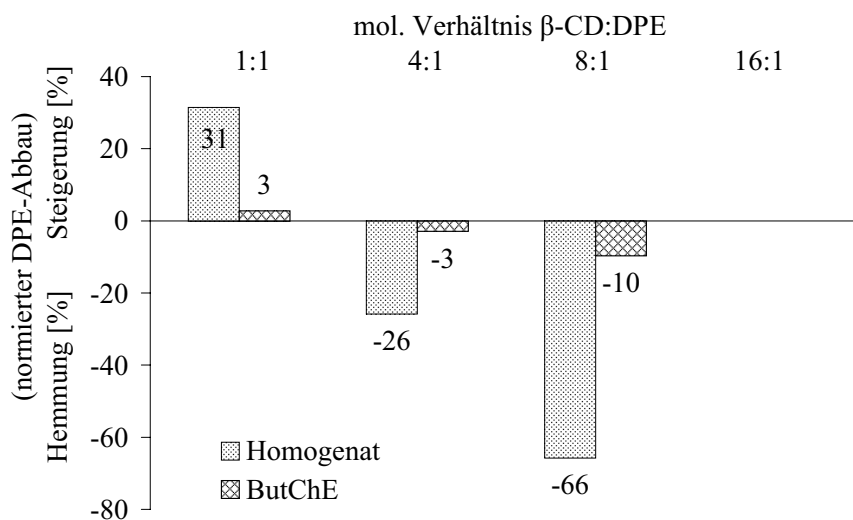


Abbildung D.15: Normierter Dipivefrin-Umsatz im Epithelhomogenat und durch ButChE in Abhängigkeit von unterschiedlichen molaren Verhältnisse von β -CD:DPE

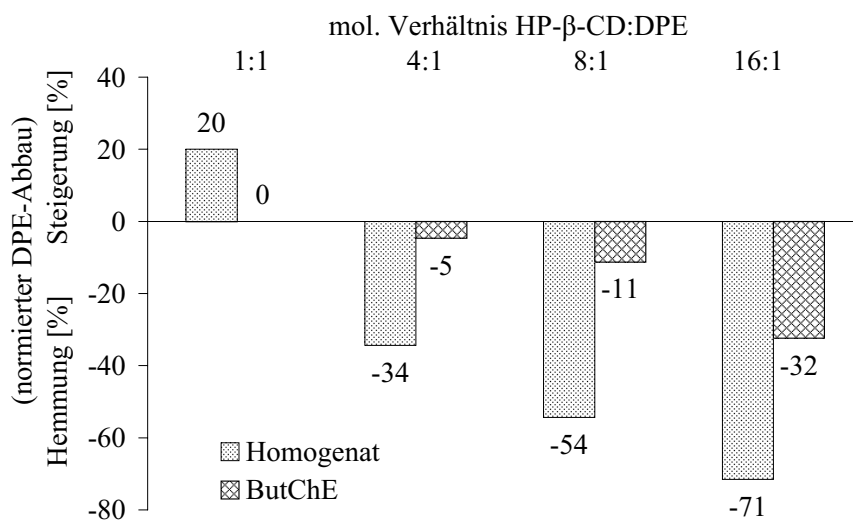


Abbildung D.16: Normierter Dipivefrin-Umsatz im Epithelhomogenat und durch ButChE in Abhängigkeit von unterschiedlichen molaren Verhältnisse von HP- β -CD:DPE

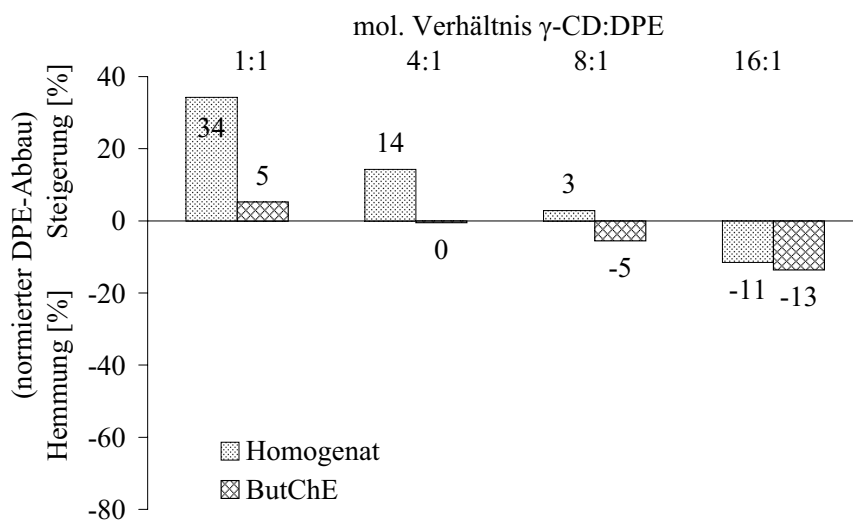


Abbildung D.17: Normierter Dipivefrin-Umsatz im Epithelhomogenat und durch ButChE in Abhängigkeit von unterschiedlichen molaren Verhältnisse von γ -CD:DPE

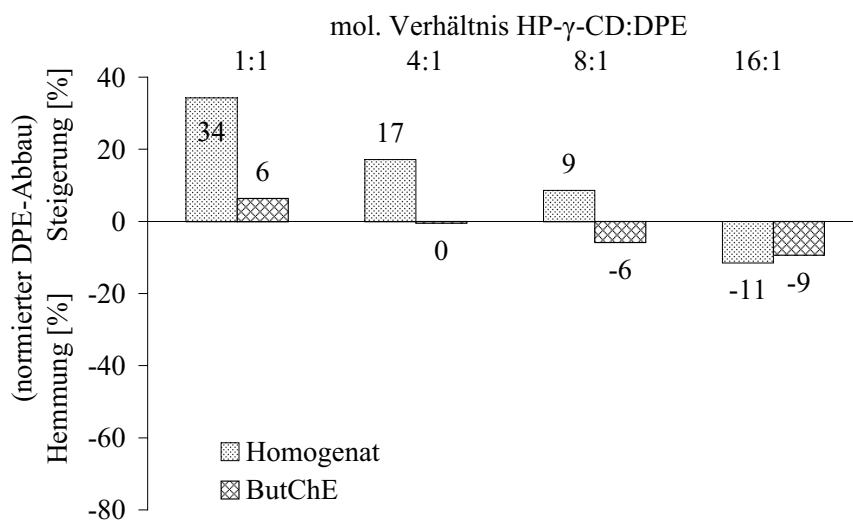


Abbildung D.18: Normierter Dipivefrin-Umsatz im Epithelhomogenat und durch ButChE in Abhängigkeit von unterschiedlichen molaren Verhältnisse von HP- γ -CD:DPE

D.5 DPE-Konzentrationen der Ultrafiltration

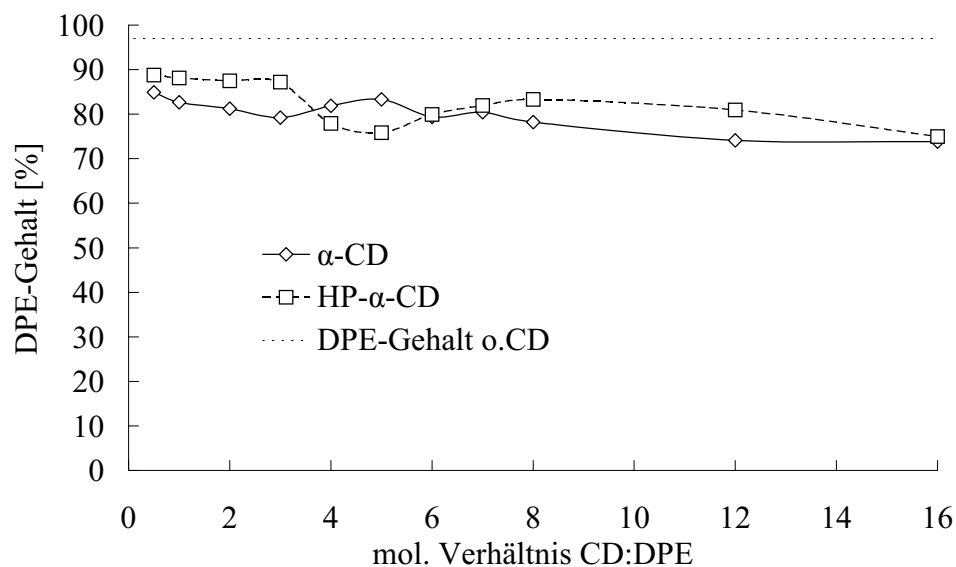


Abbildung D.19: Konzentration von DPE im Permeat der Ultrafiltration unter Einfluss steigender Konzentrationen von α - und HP- α -CD, \bar{x} , $s_{rel} \leq 0,75\%$, $n=3$

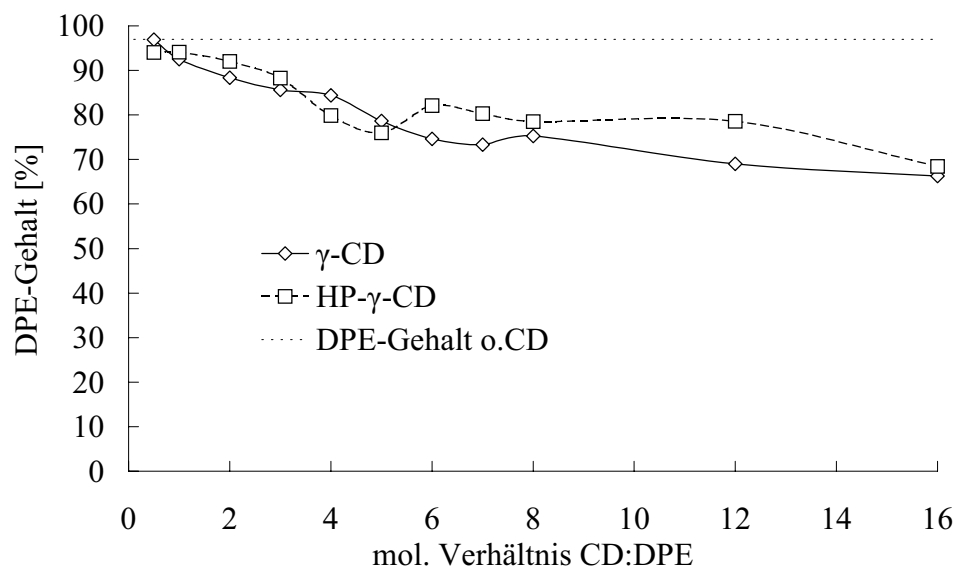


Abbildung D.20: Konzentration von DPE im Permeat der Ultrafiltration unter Einfluss steigender Konzentrationen von γ - und HP- γ -CD, \bar{x} , $s_{rel} \leq 0,78\%$, $n=3$

D.6 Permeatmengen der Ultrafiltration

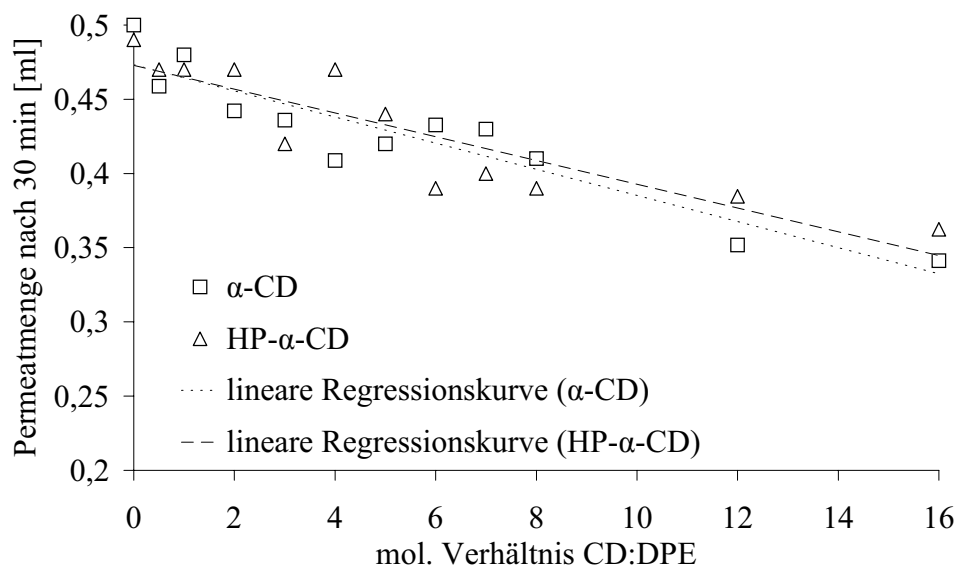


Abbildung D.21: Permeatmenge der Ultrafiltration unter Einfluss steigender Konzentrationen von α - und HP- α -CD, \bar{x} , $n=3$

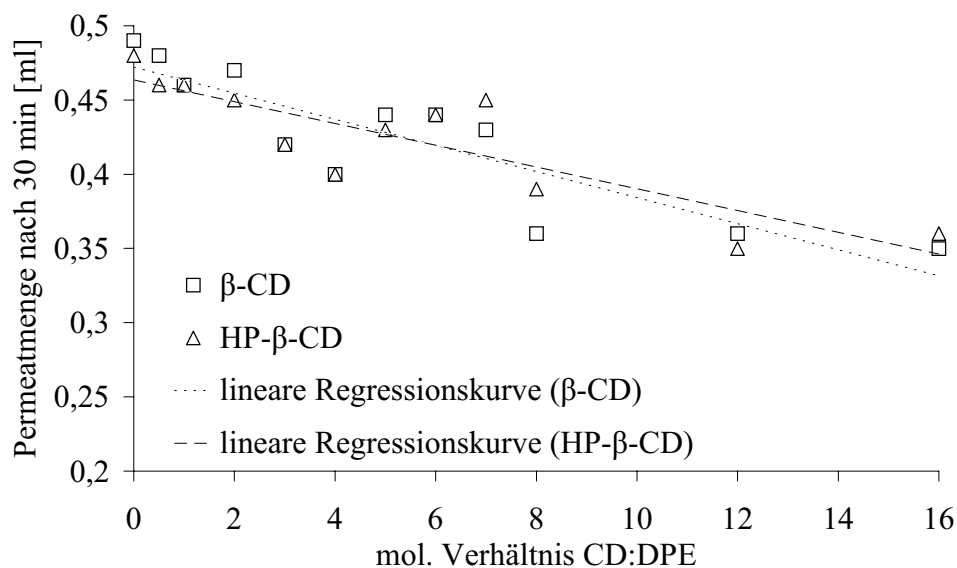


Abbildung D.22: Permeatmenge der Ultrafiltration unter Einfluss steigender Konzentrationen von β - und HP- β -CD, \bar{x} , $n=3$

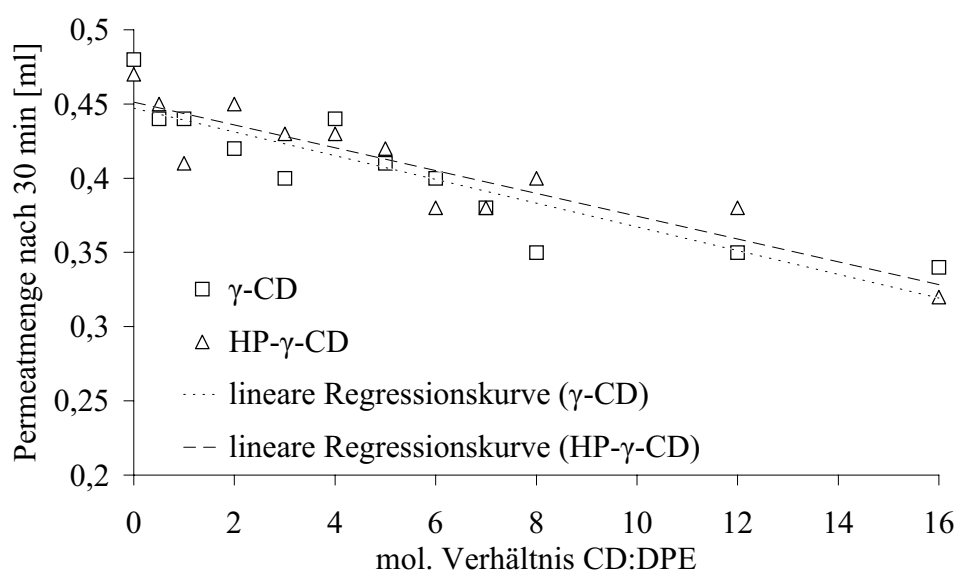


Abbildung D.23: Permeatmenge der Ultrafiltration unter Einfluss steigender Konzentrationen von γ - und HP- γ -CD, \bar{x} , $n=3$

D.7 Normierte UV-Absorptionsänderungen

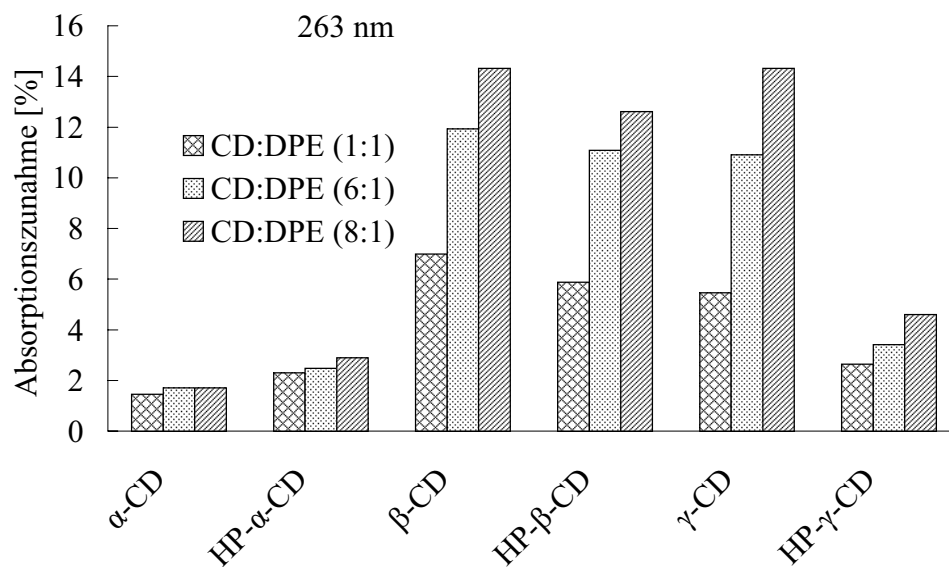


Abbildung D.24: Normierte UV-Absorptionsänderung von DPE bei 263 nm als Funktion der unterschiedlichen Molverhältnisse CD:DPE

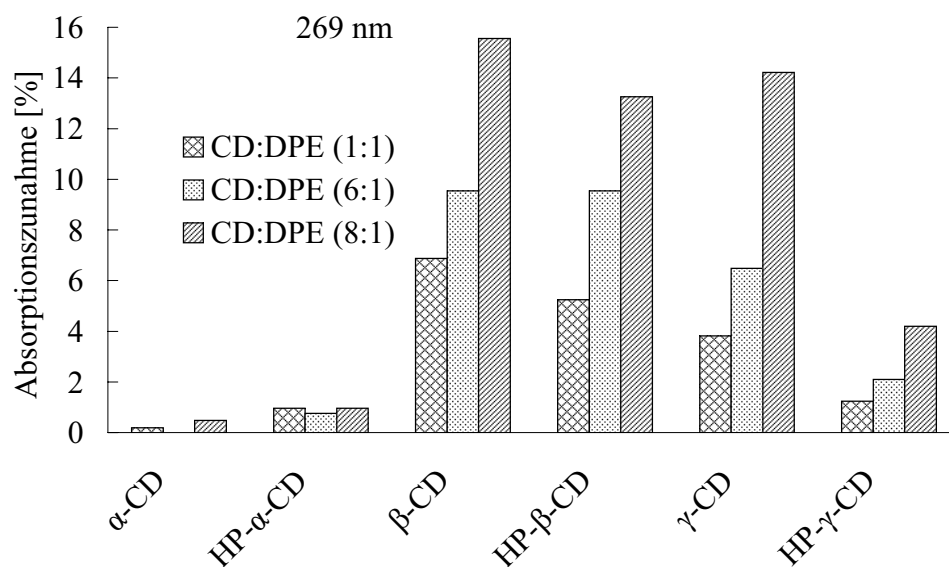


Abbildung D.25: Normierte UV-Absorptionsänderung von DPE bei 269 nm als Funktion der unterschiedlichen Molverhältnisse CD:DPE

D.8 Prozentuale Änderung der Nettoretentionszeiten

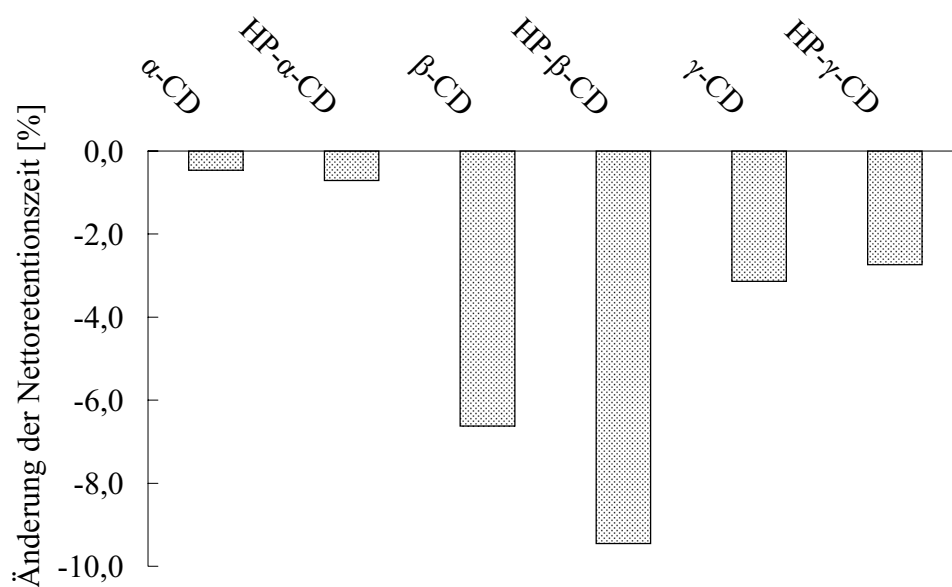


Abbildung D.26: Prozentuale Änderung der Nettoretentionszeiten von DPE in Abhängigkeit von verschiedenen Cyclodextrinen in der mobilen Phase

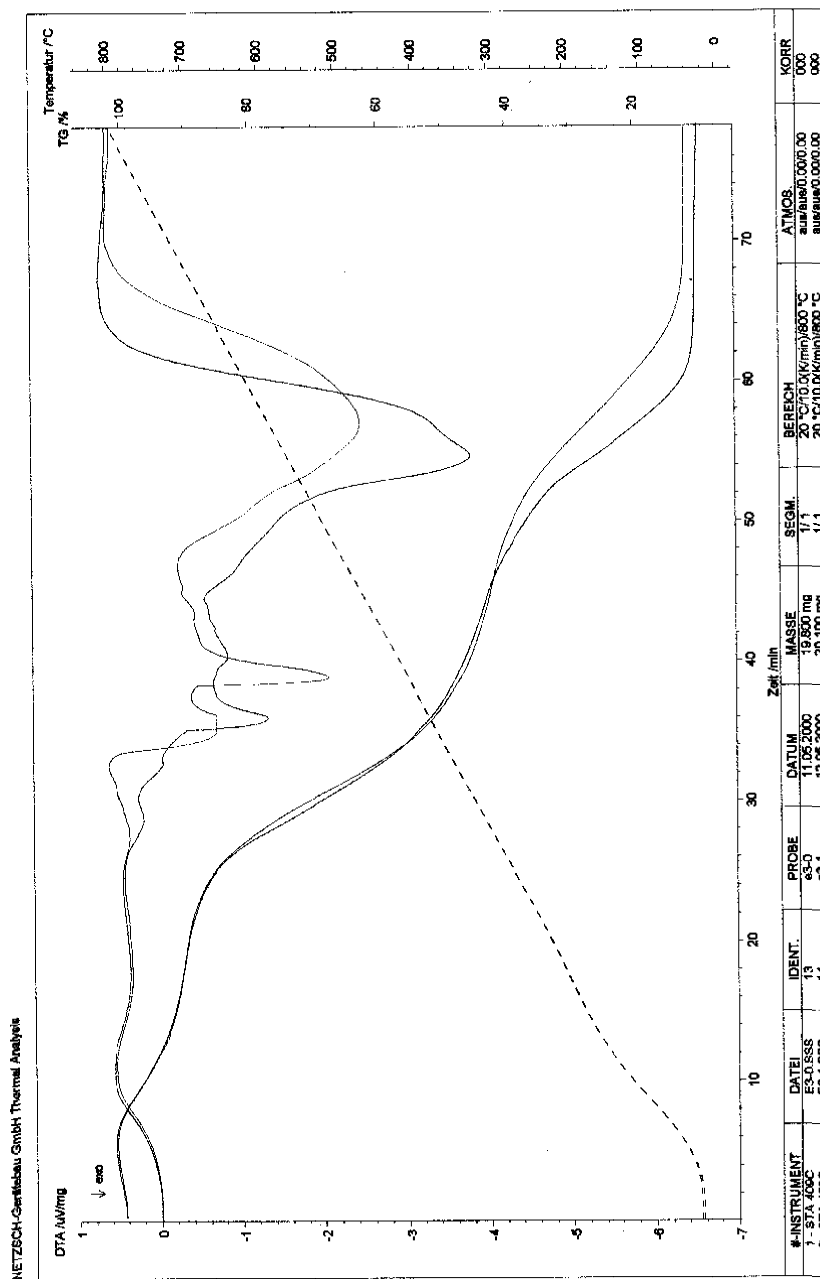


Abbildung D.28: DTA/TG-Diagramme, Inkubierte Probe mit DPE/ β -CD in Puffer gegen Vergleichswert mit reinem Puffer

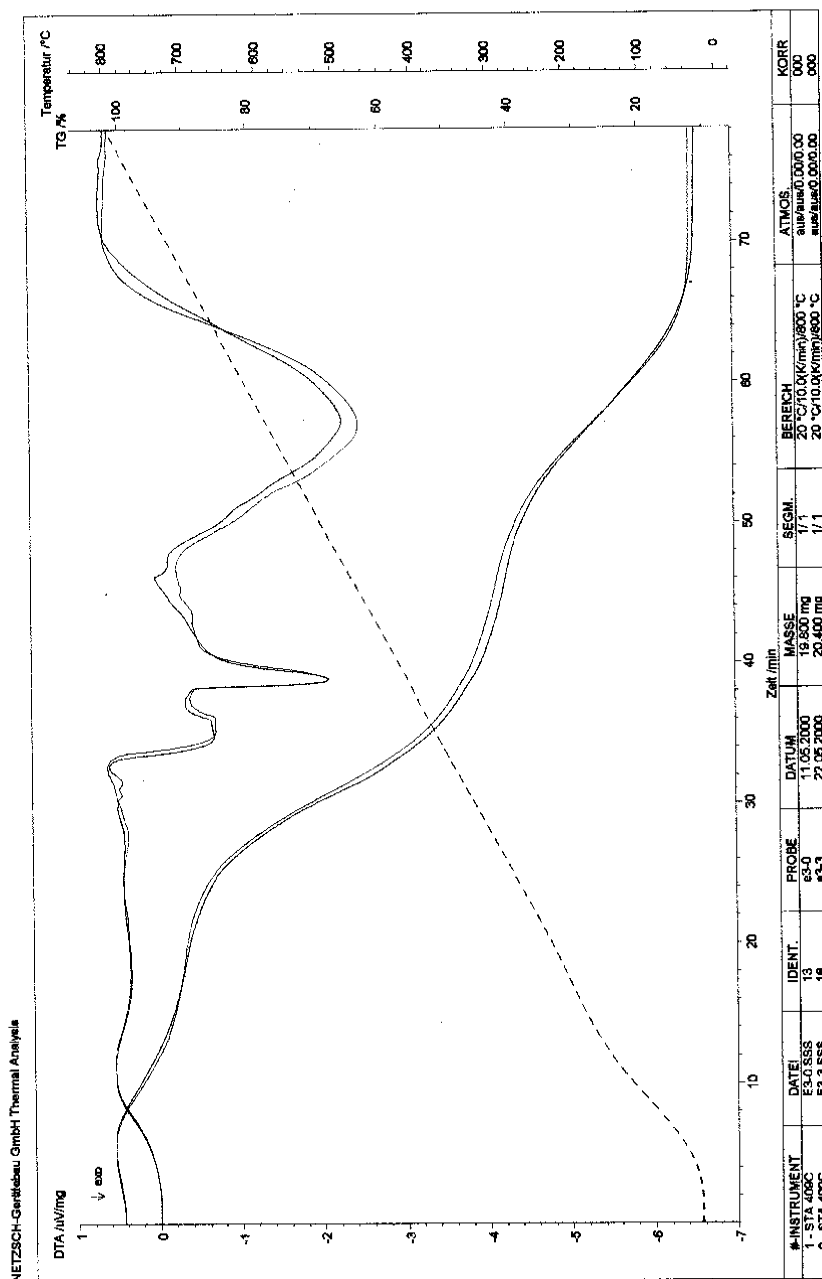


Abbildung D.29: DTA/TG-Diagramme, Inkubierte Probe mit DPE/ β -CD in Puffer nach zwei Nachinkubationen mit reinem Puffer gegen Vergleichswert mit reinem Puffer

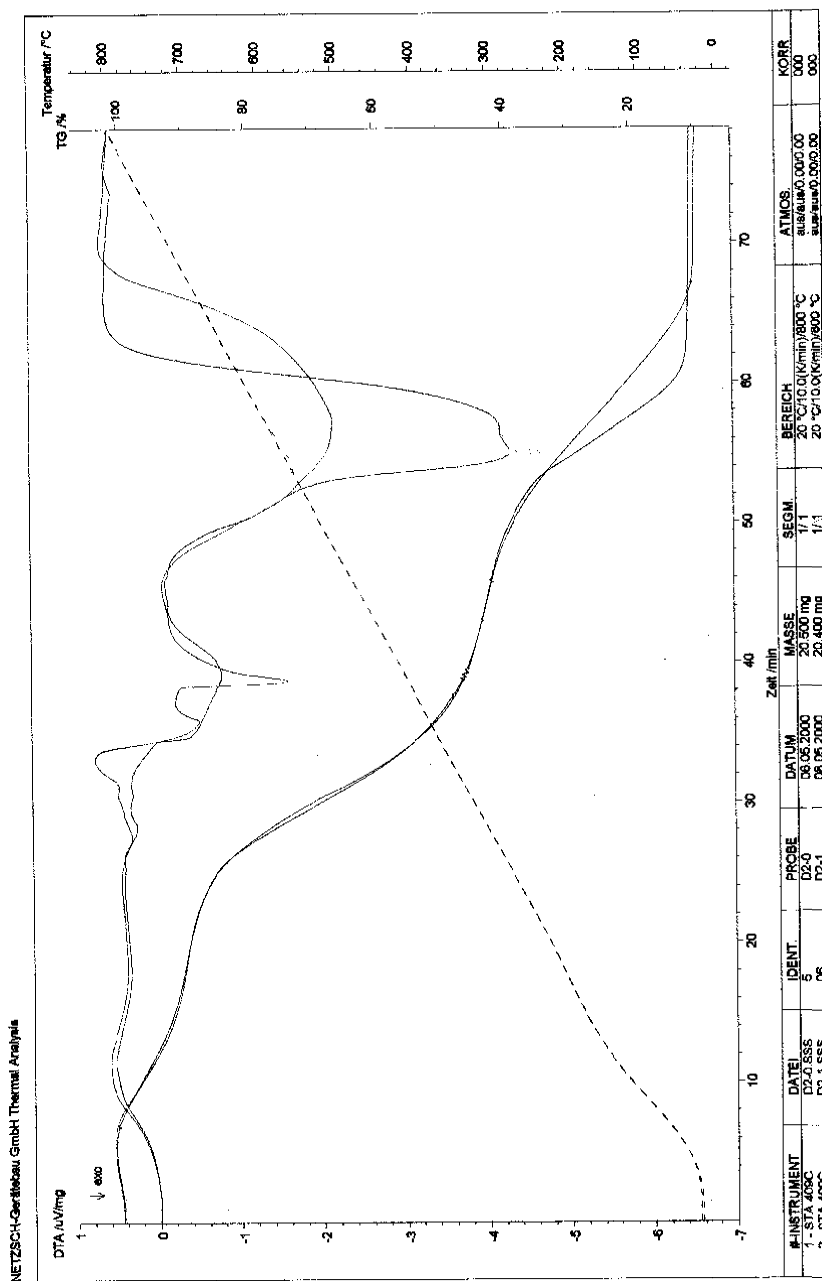


Abbildung D.30: DTA/TG-Diagramme, Inkubierte Probe mit DPE/ α -CD in Puffer gegen Vergleichswert mit reinem Puffer

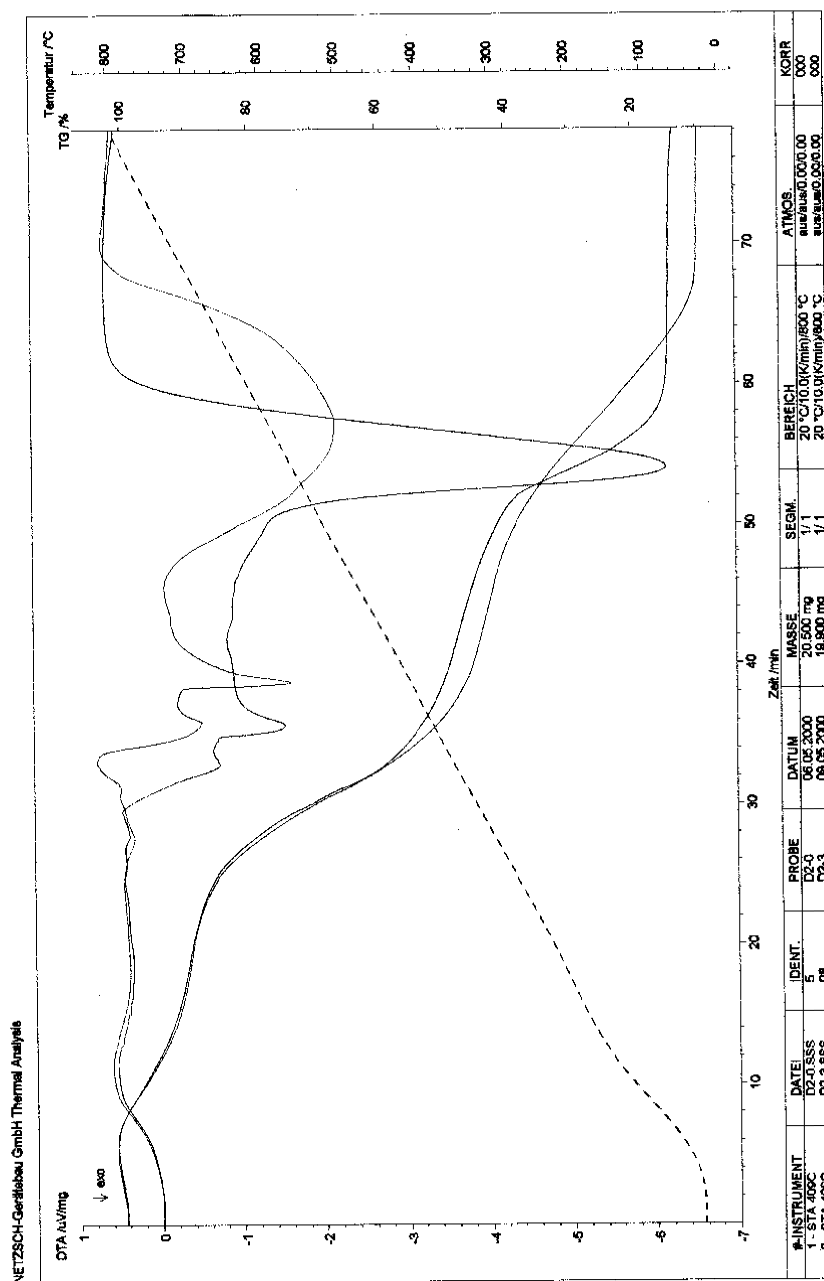


Abbildung D.31: DTA/TG-Diagramme, Inkubierte Probe mit DPE/ α -CD in Puffer nach zwei Nachinkubationen mit reinem Puffer gegen Vergleichswert mit reinem Puffer

D.10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Corneaschnitten, Vergrößerung 320x

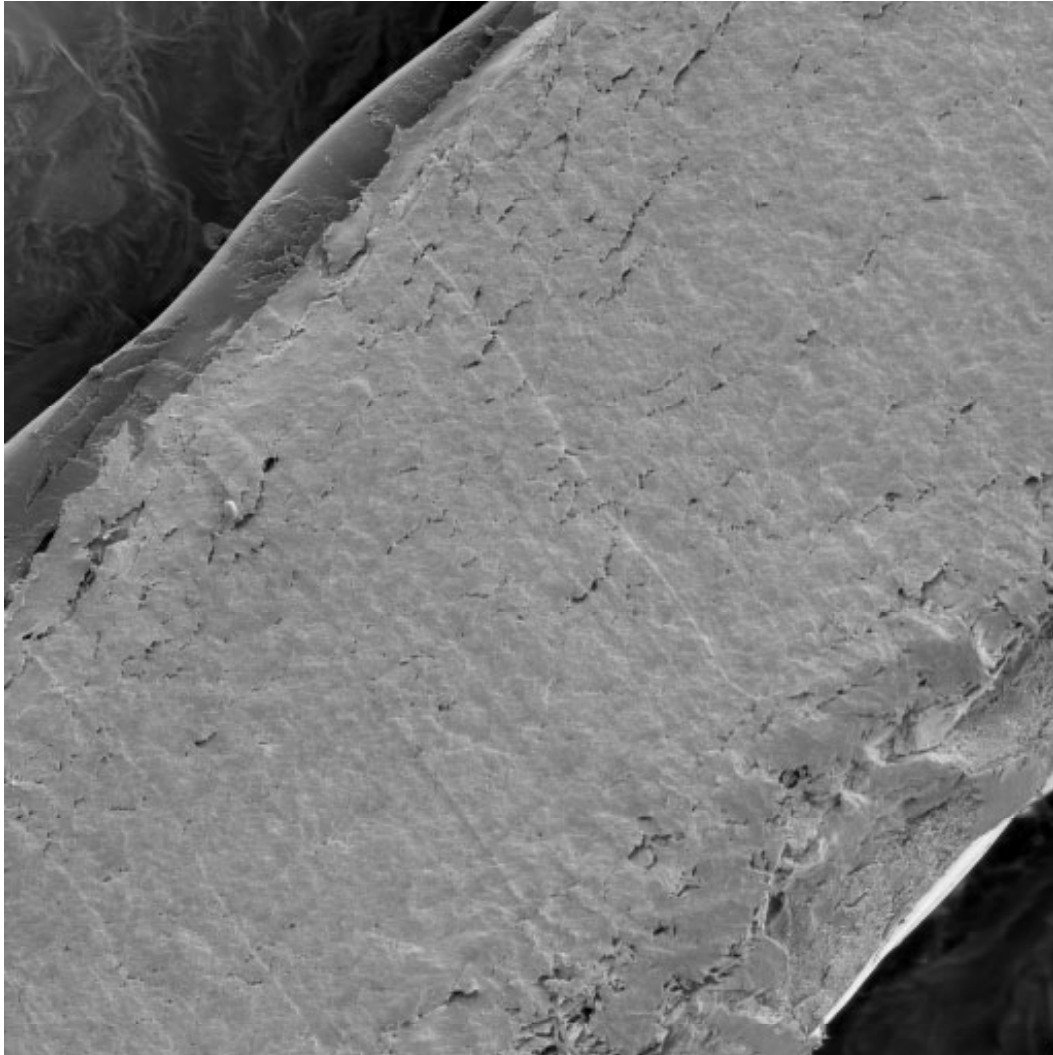


Abbildung D.32: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Corneaschnittes; Probenaufbereitung nach erfolgter Inkubation der Cornea in Pufferlösung pH 7,4, Vergrößerung 320x bei 4,00 kV

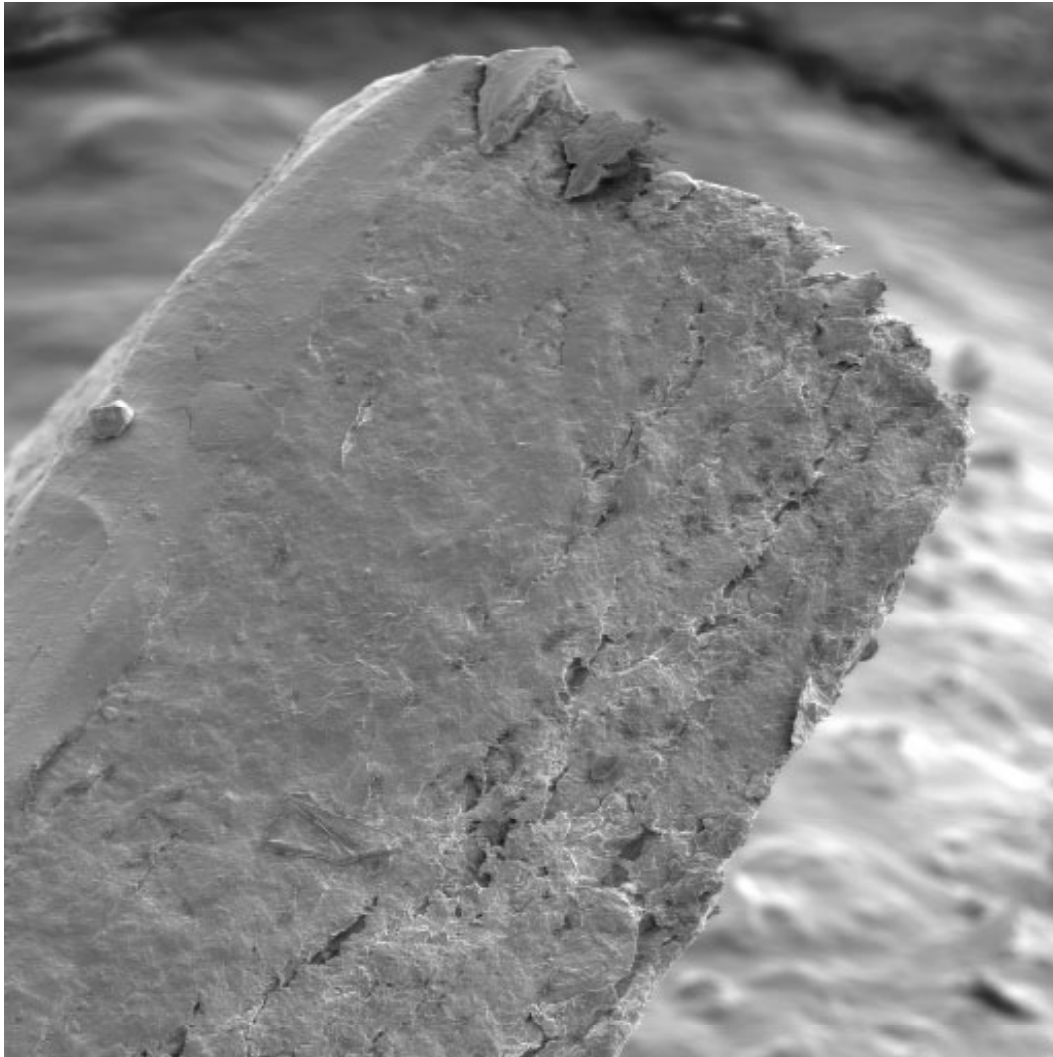


Abbildung D.33: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Corneaschnittes; Probenaufbereitung nach erfolgter Inkubation der Cornea in Pufferlösung pH 7,4 unter Zusatz von DPE, Vergrößerung 320x bei 4,00 kV

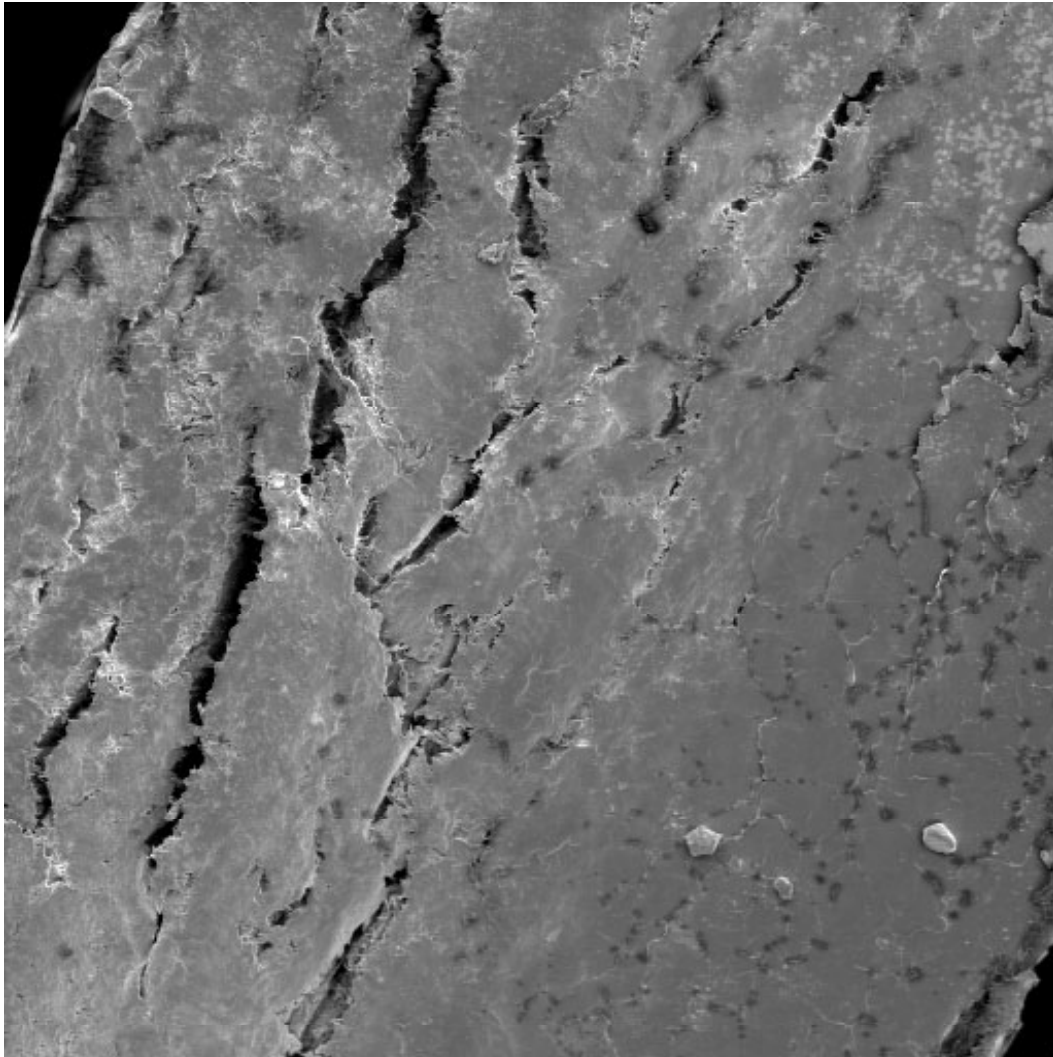


Abbildung D.34: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Corneaschnittes; Probenaufbereitung nach erfolgter Inkubation der Cornea in Pufferlösung pH 7,4 unter Zusatz von α -CD, Vergrößerung 320x bei 4,00 kV

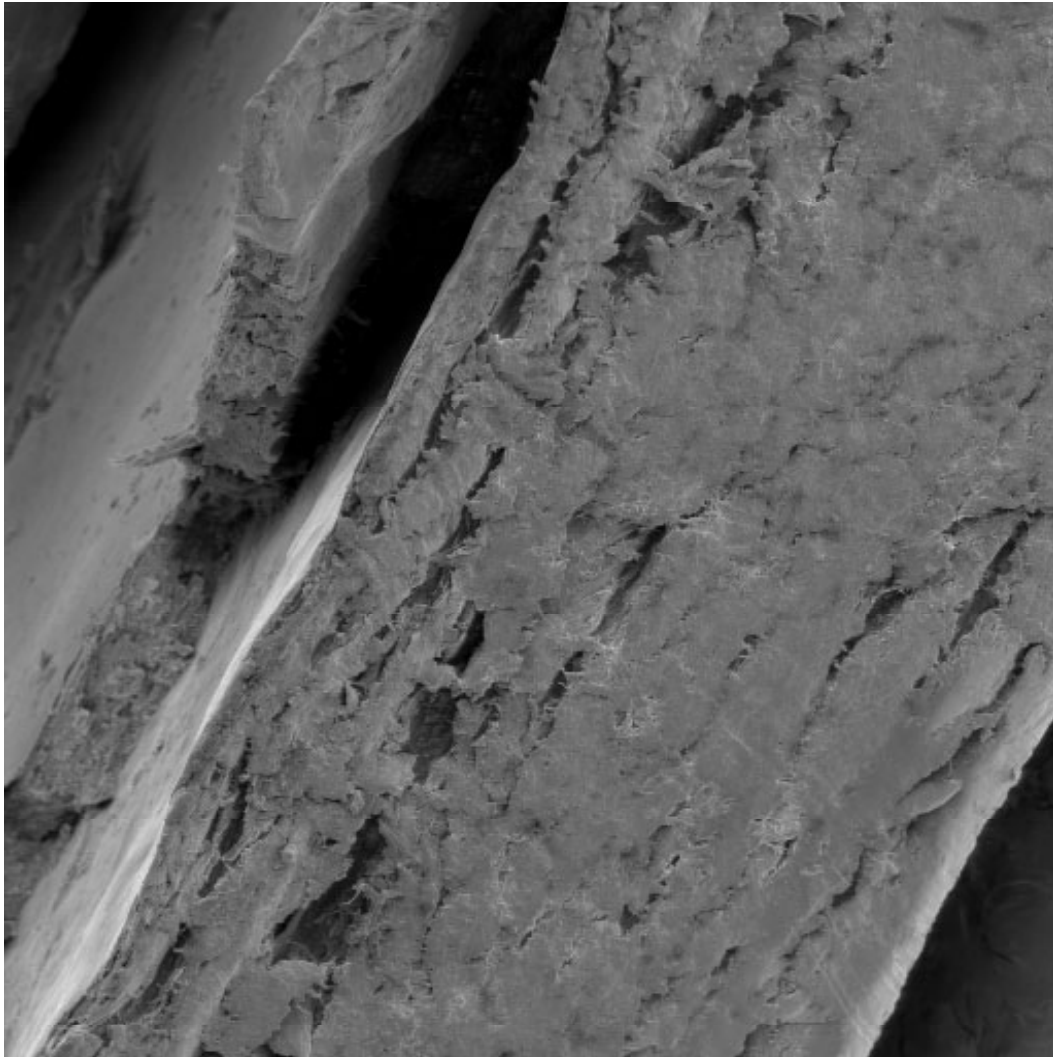


Abbildung D.35: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Corneaschnittes; Probenaufbereitung nach erfolgter Inkubation der Cornea in Pufferlösung pH 7,4 unter Zusatz von β -CD, Vergrößerung 320x bei 4,00 kV

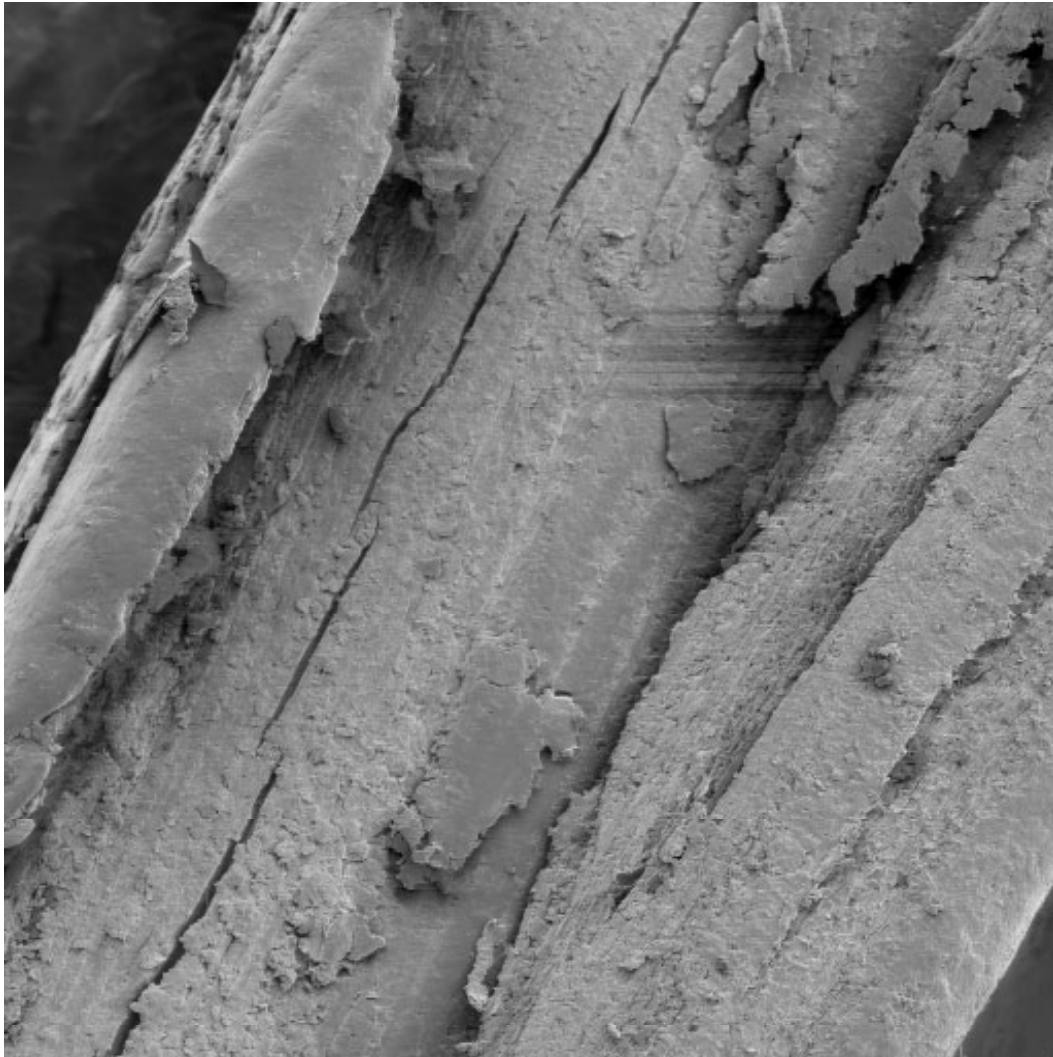


Abbildung D.36: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Corneaschnittes; Probenaufbereitung nach erfolgter Inkubation der Cornea in Pufferlösung pH 7,4 unter Zusatz von DPE und α -CD, Vergrößerung 320x bei 4,00 kV

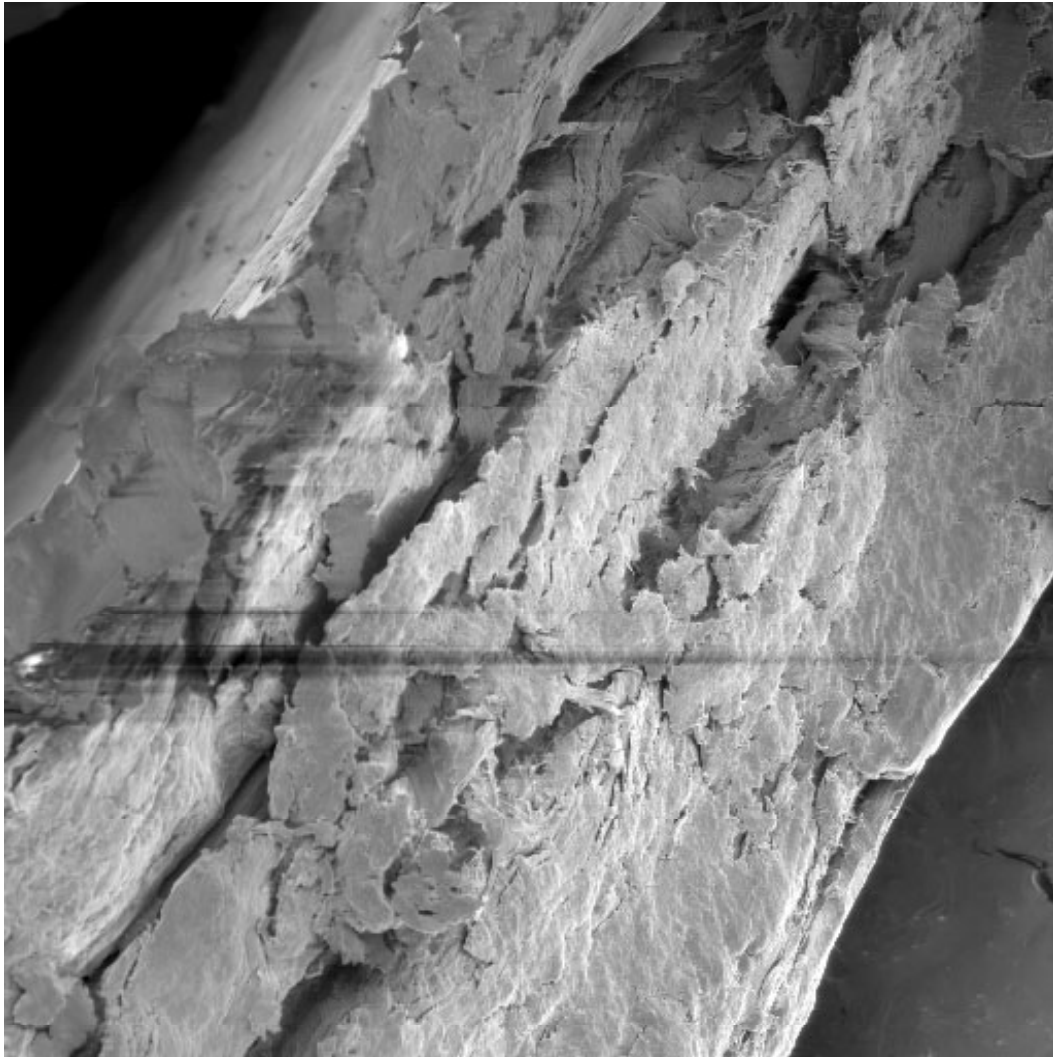


Abbildung D.37: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Corneaschnittes; Probenaufbereitung nach erfolgter Inkubation der Cornea in Pufferlösung pH 7,4 unter Zusatz von DPE und β -CD, Vergrößerung 320x bei 4,00 kV

D.11 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Corneaschnitten, Vergrößerung 2000x

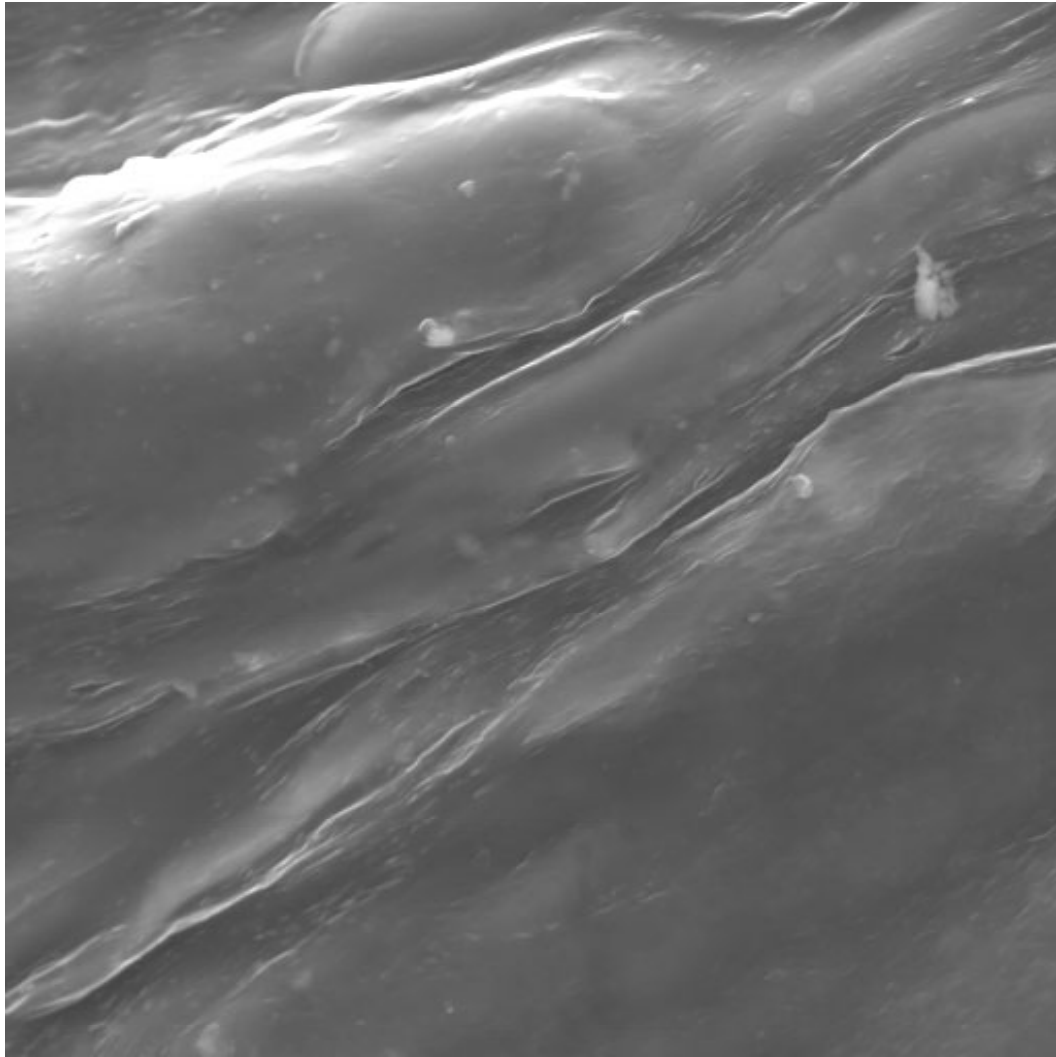


Abbildung D.38: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Corneaschnittes; Probenaufbereitung nach erfolgter Inkubation der Cornea in Pufferlösung pH 7,4 unter Zusatz von DPE, Vergrößerung 2000x bei 15,00 kV

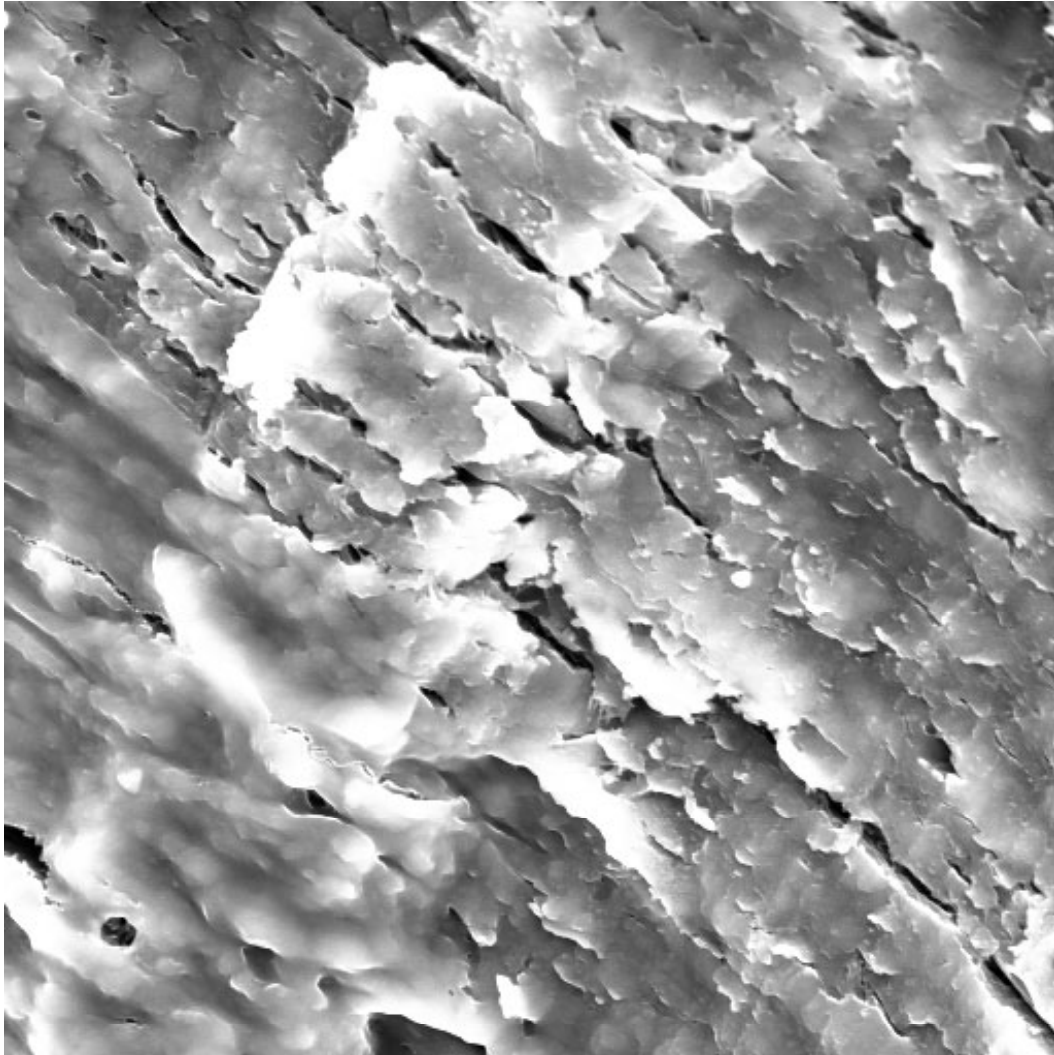


Abbildung D.39: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Corneaschnittes; Probenaufbereitung nach erfolgter Inkubation der Cornea in Pufferlösung pH 7,4 unter Zusatz von DPE und α -CD, Vergrößerung 2000x bei 15,00 kV

D.12 Permeationen durch Schweinecornea

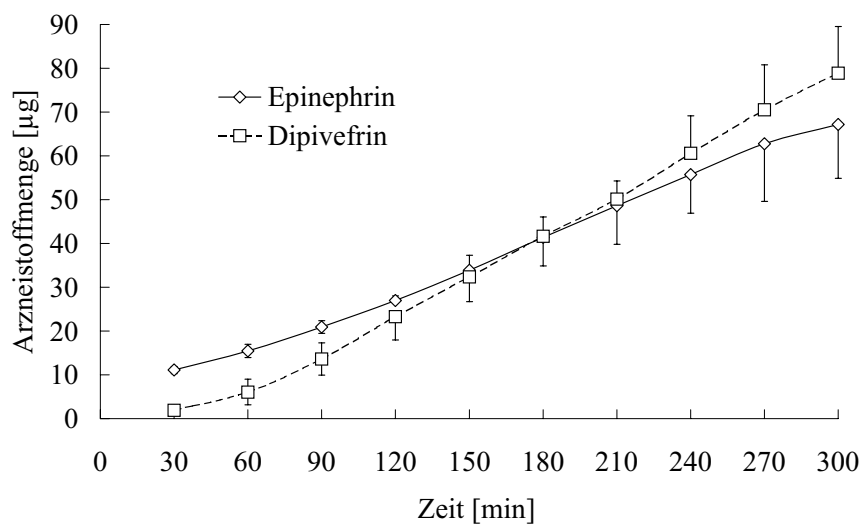


Abbildung D.40: Permeierte Menge von DPE und während der Permeation enzymatisch gebildete Menge von EPI unter Zusatz von $123 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ α -CD zum Donator; $\bar{x} \pm s$, $n=3$

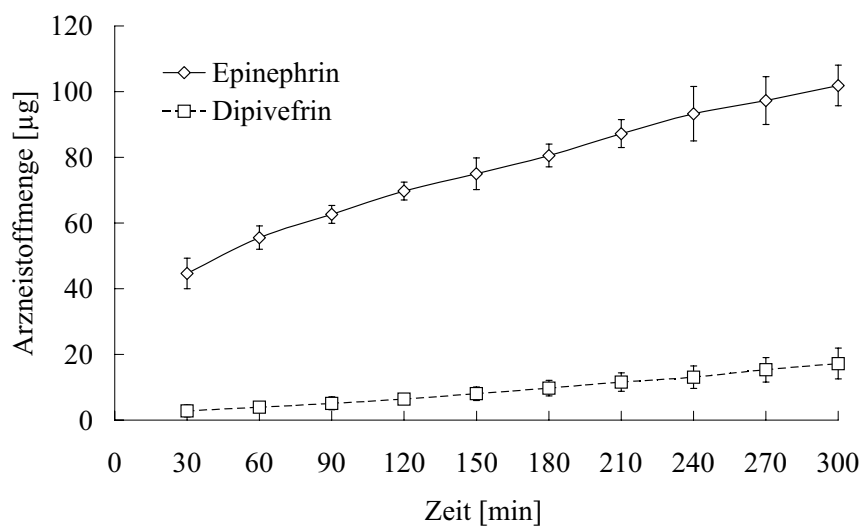


Abbildung D.41: Permeierte Menge von DPE und während der Permeation enzymatisch gebildete Menge von EPI unter Zusatz von $123 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ γ -CD zum Donator; $\bar{x} \pm s$, $n=3$

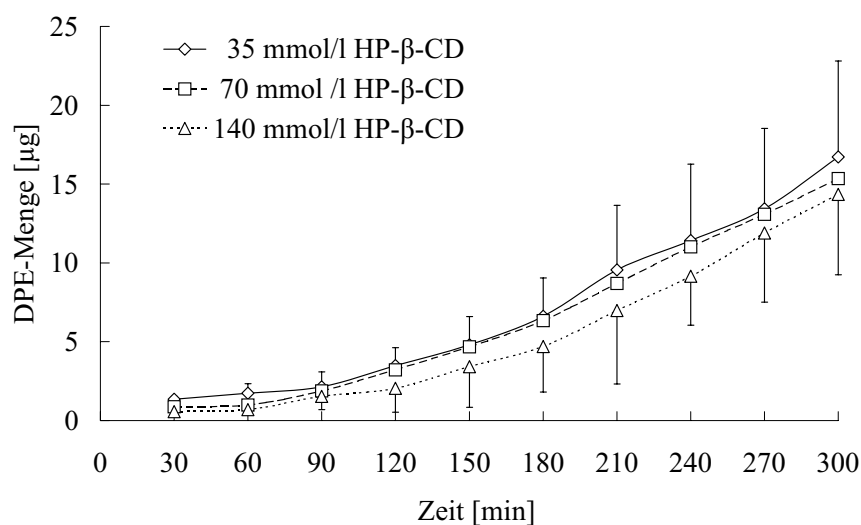


Abbildung D.42: Permeierte Menge von DPE unter Zusatz von 35, 70, 140 mmol·l⁻¹ HP-β-CD zum Donator; $\bar{x} \pm s$, n=3

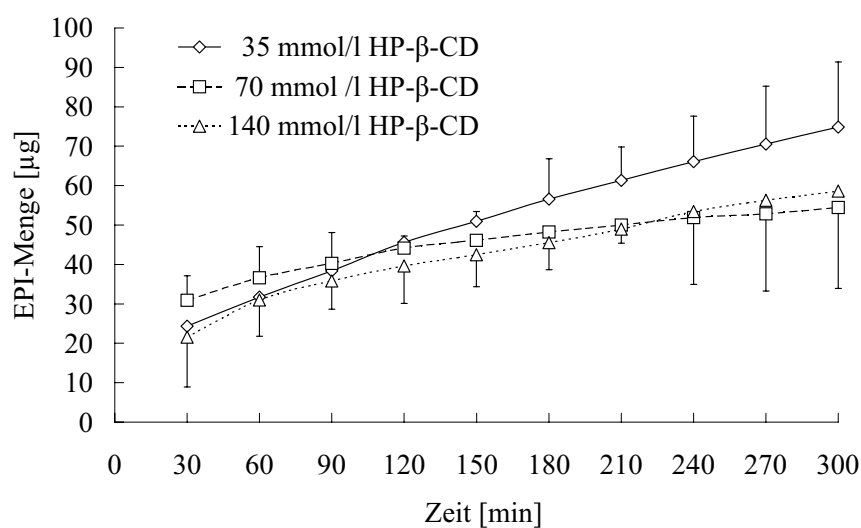


Abbildung D.43: Enzymatisch gebildete Menge von EPI bei der Permeation von DPE unter Zusatz von 35, 70, 140 mmol·l⁻¹ HP-β-CD zum Donator; $\bar{x} \pm s$, n=3

Lebenslauf

Name:	Udo Rettkowski
Geburtsdatum:	27. April 1969
Geburtsort:	Halle/Saale
1975 – 1977	Besuch der POS „Albrecht Dürer“ (Halle/S.)
1977 – 1985	Besuch der POS „Dr. Kurt Fischer“ (Halle/S.) (Schule mit erweitertem Russischunterricht)
1985 – 1987	Besuch der EOS „Adolf Reichwein“ (Halle/S.) (Schule mit erweitertem Russisch- und Englischunterricht) Abschluss des Abiturs
Sep. 1987 – Okt. 1997	Praktikum, Mohren-Apotheke (Halle/S.)
Nov. 1987 – Jan. 1990	Wehrdienst
Mär. 1990 – Jul. 1990	Praktikum, Hirsch-Apotheke (Halle/S.)
Okt. 1990 – Sep. 1994	Studium der Pharmazie Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
Okt. 1994 – Mär. 1995	Diplomarbeit Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie
Lehrstuhl Prof. Dr. P. Pfügel

Thema: „Thermodynamik des Lösungsprozesses
von Indometacin in lipoiden Vehikeln“

24. März 1995	Diplom-Pharmazeut
Apr. 1995 – Sep. 1995	Pflichtpraktikum, August-Bebel-Apotheke (Halle/S.)
28. Oktober 1995	Approbation als Apotheker
Dez. 1995 – Aug. 1996	Angestellter Apotheker, Apotheke im Pankemarkt (Zepernick)
Sep. 1996 – Sep. 1997	Angestellter Apotheker, Berliner Bär Apotheke (Berlin)
Sommersemester 1997	Lehrbeauftragter für das Praktikum: „Arzneiformenlehre I“ Humboldt-Universität zu Berlin Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie
Okt. 1997 – Aug. 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Doktorand Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie Lehrstuhl Prof. Dr. S. Keipert
Wintersemester 98/99 – Wintersemester 01/02	Lehrbeauftragter für das Praktikum: „Galenisches Praktikum“ für Veterinärmediziner Freien Universität Berlin Fachbereich Veterinärmedizin Institut für Pharmakologie und Toxikologie
seit Sep. 2002	Angestellter Apotheker P. W. Beyvers GmbH, Berlin

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfasst zu haben und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Udo Rettkowski

17. Dezember 2002